

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 755**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2010 PCT/EP2010/055479**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO2010122160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2010 E 10715822 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2422203**

54 Título: **Método para diagnosticar un trastorno relacionado con hemoglobina**

30 Prioridad:

**24.04.2009 EP 09305352**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
PSUD - UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI (25.0%);  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (25.0%) y  
UPEC - UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE MARNE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**BAUDIN-CREUZA, VÉRONIQUE;  
VASSEUR, CORINNE y  
GALACTEROS, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 617 755 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

Método para diagnosticar un trastorno relacionado con hemoglobina

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un método para diagnosticar y/o estadificar un trastorno relacionado con hemoglobina, tal como  $\beta$ -talasemias, en un sujeto que lo necesite.

10 La invención también se refiere a un método para hacer un seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite.

**Estado de la técnica**

15 El desarrollo normal de los glóbulos rojos requiere una síntesis coordinada de las subunidades de hemoglobina (Hb), la  $\alpha$  y  $\beta$ -globina en el caso de hemoglobina adulta (Hb A). Las cadenas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -globina se codifican por genes en diferentes cromosomas, 16 y 11 respectivamente, y su expresión está controlada independientemente. En el glóbulo rojo normal, se producen ligeramente más cadenas  $\alpha$  y cadenas  $\beta$ . A diferencia de las cadenas de  $\beta$ -hemoglobina ( $\beta$ -Hb) que son solubles y forman tetrámeros homólogos, las cadenas de  $\alpha$ -hemoglobina libres ( $\alpha$ -Hb) son altamente inestables, y cuando están en exceso, forman precipitados y actúan como oxidantes activos que causan apoptosis y eritropoyesis ineficaz.

20 Las  $\beta$ -talasemias son enfermedades recesivas autosómicas heredadas caracterizadas por una reducción o abolición de la síntesis de cadena de  $\beta$ -globina normal induciendo eritropoyesis ineficaz (Weatherall, 2004). Las consecuencias incluyen anemia, de diferente gravedad según las mutaciones implicadas, otros varios trastornos graves debido al incremento en eritropoyesis medular, crecimiento de estatura y estructura ósea dañados, renovación de hierro acelerada, y catabolismo de hematina, y sus propias consecuencias clínicas.

25 En 2002, se informó de la chaperona molecular de  $\alpha$ -Hb, la "Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina" (AHSP) (Kihm y col., 2002). Esta proteína pequeña de 102 aminoácidos está presente a un alto nivel (0,1 mM) en precursores de glóbulo rojo humano y su síntesis está bajo el control de GATA-1, un factor de transcripción eritroide fundamental. Esta proteína se codifica por el cromosoma 16. También, a diferencia de la mayoría de otras chaperonas moleculares, que se expresan mucho y relativamente son promiscuas con respecto a interacciones de sustrato, AHSP parece ser sumamente específica a tejido y sustrato. AHSP se une específicamente a  $\alpha$ -Hb para formar un heterodímero soluble estable pero no a  $\beta$ -hub o a Hb A tetramérica (Kihm y col., 2002; Gell y col., 2002). Por lo tanto, el papel de AHSP podría ser prevenir la agregación de  $\alpha$ -Hb libre hasta que el encuentro de las cadenas  $\beta$ ,  $\delta$  o  $\gamma$  permita la formación de las correspondientes Hb tetraméricas. En los glóbulos rojos de pacientes  $\beta$ -talasémicos, AHSP actúa como un atrapante (*scavenger*) del conjunto de cadena  $\alpha$  libre pero se puede reprimir mediante una producción defectuosa o el nivel de disponibilidad de cadenas similares a  $\beta$ . Por tanto, los monómeros de  $\alpha$ -Hb libres en los glóbulos rojos sobrecargan la capacidad de AHSP y precipitan, dañando la célula y desencadenando la apoptosis celular. Para pacientes  $\beta$ -talasémicos, el conjunto de cadena  $\alpha$  libre en el glóbulo rojo puede así reflejar la gravedad de un síndrome de  $\beta$ -talasemia.

30 En base a la identificación de AHSP, la Solicitud de Patente Americana 2005/0028229 describe un método de diagnóstico de un trastorno relacionado con AHSP en un sujeto de ensayo tal como  $\beta$ -talasemia mediante la determinación de la presencia en una muestra de dicho sujeto de ensayo de AHSP y, si está presente, determinando el nivel de expresión.

35 Sin embargo, actualmente el diagnóstico de  $\beta$ -talasemia aún se basa en los parámetros hematológicos de los pacientes y el diagnóstico molecular se obtiene por técnicas de PCR. Hoy en día se han caracterizado más de 200 mutaciones diferentes de  $\beta$ -talasemia (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>), la mayoría de las cuales son mutaciones puntuales o deleciones/inserciones muy cortas. La mayoría de estas mutaciones son específicas a país o población, y hoy en día se han determinado sus distribuciones para la mayoría de las poblaciones en riesgo. La estrategia para identificar estas mutaciones normalmente se basa en el hecho de que la mayoría de las poblaciones tienen justo unas pocas mutaciones comunes y un número variable de raras. La gravedad de la  $\beta$ -talasemia depende principalmente de la naturaleza de la mutación. Están descritos dos clases principales de trastornos, primero la  $\beta^0$ -talasemia ( $\beta^0$ -thal) en la que no se producen cadenas  $\beta$  y segundo la  $\beta^+$ -talasemia ( $\beta^+$ -thal) en la que se sintetizan algunas cadenas  $\beta$  normales. Las manifestaciones clínicas de  $\beta$ -talasemia son extremadamente diversas extendiéndose desde anemia grave y dependencia de transfusión al estado asintomático del rasgo de  $\beta$ -talasemia (Thein, 2005). Más generalmente uno puede necesitar considerar el desequilibrio general entre la familia  $\alpha$  y P de las cadenas de globina, para incluir los diferentes estados de desarrollo; por ejemplo, la familia P incluye las cadenas fetales ( $\gamma$ ) y adultas ( $\beta$ ). La gran variabilidad en la expresión fenotípica de la  $\beta$ -talasemia también depende de la asociación con algunos modificadores de la síntesis de Hb que pueden modificar la razón biosintética  $\alpha$  entre el grupo  $\beta$  y  $\alpha$ -globina.

65

Por tanto, el mecanismo patológico central de  $\beta$ -talasemia es el desequilibrio entre la síntesis de la familia alfa y beta ( $\gamma+\beta$ ) de cadenas de globina (Weatherall y Clegg, 2001) y la gravedad de esta enfermedad está directamente correlacionada con el grado de desequilibrio de la cadena de globina. El estudio *in vitro* de la síntesis de las cadenas de  $\alpha$ - y  $\gamma+\beta$ -globina de Hb a partir de reticulocitos de sangre periférica puso de relieve en 1965 este desequilibrio de síntesis de globina en talasemia (Weatherall y col., 1965). Muchos de los posteriores estudios han informado la misma utilidad de medir el desequilibrio de la síntesis de cadena de globina a partir de reticulocitos  $\beta$ -talasémicos, pero todos los diferentes métodos de laboratorio se basan en la incorporación de un aminoácido radioactivo en la biosíntesis de la subunidad a partir de la sangre periférica (Kim y col., 1977). Tal método ciertamente no se podría considerar como práctica rutinaria de laboratorio.

Resulta que actualmente no hay una prueba simple y rápida para evaluar este parámetro. En exámenes hematológicos rutinarios, el exceso de  $\alpha$ -Hb libre se puede distinguir en citología por la presencia de cuerpos de inclusión que corresponden a la  $\alpha$ -Hb desnaturalizada y precipitada pero este planteamiento no es específico de la  $\alpha$ -Hb y es solamente cualitativo. Es un procedimiento engorroso, caro y requiere mucho tiempo.

De hecho, la única técnica para cuantificar el exceso relativo de  $\alpha$ -Hb libre es llevar a cabo la biosíntesis de globina *in vitro* en presencia de un aminoácido radiactivo. Esta tecnología se ha usado en laboratorios de investigación en las décadas de 1970, 1980 y la medición de la cantidad de radioactividad en diferentes fracciones de globina recogidas permite una determinación de la razón de síntesis de cadena  $\alpha/\beta$ . Este método de caracterización está cada vez menos en uso, incluso en laboratorios de investigación, debido al uso de la radiactividad.

Además, hasta muy recientemente, se consideró que era imposible detectar o cuantificar  $\alpha$ -Hb libre puesto que el exceso de  $\alpha$ -Hb precipita en precursores eritroides en la médula ósea (dando como resultado eritropoyesis ineficaz), causando su destrucción prematura, y aunque parcialmente sometidos a proteólisis se unen a la membrana celular de células eritroides adultas, conduciendo a su hemólisis y fomentando la apoptosis (Bank, 2007 y Yu y col., 2007).

Por lo tanto, hay una necesidad de un método para diagnosticar fácilmente y/o estadificar un trastorno relacionado con hemoglobina tal como  $\beta$ -talasemias llevado a cabo sin usar técnica molecular o radiactiva.

### Objeto de la invención

La invención se refiere a un método para diagnosticar y/o estadificar un trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método:

- poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con una pareja de unión específica a alfa hemoglobina ( $\alpha$ -Hb) seleccionada entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (AHSP) y beta hemoglobina ( $\beta$ -Hb),
- detectar y/o cuantificar la presencia de  $\alpha$ -Hb libre en dicha muestra biológica, y
- correlacionar dicha cantidad de  $\alpha$ -Hb libre con el diagnóstico y/o la estadificación de un trastorno relacionado con hemoglobina en dicho sujeto,

siendo el trastorno relacionado con hemoglobina seleccionado entre  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómicas, anemia, anemia falciforme, variantes de Hb inestables o persistencia hereditaria de Hb fetal.

La invención también se refiere a un método para hacer un seguimiento de un tratamiento frente a un trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método:

- poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con una pareja de unión específica a alfa hemoglobina ( $\alpha$ -Hb) seleccionada entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (AHSP) y beta hemoglobina ( $\beta$ -Hb),
- detectar y/o cuantificar la presencia de  $\alpha$ -Hb libre en dicha muestra biológica, y
- correlacionar dicha cantidad de  $\alpha$ -Hb libre con el seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina en dicho sujeto,

siendo el trastorno relacionado con hemoglobina seleccionado entre  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómicas, anemia, anemia falciforme, variantes de Hb inestables o persistencia hereditaria de Hb fetal.

**Descripción detallada de la invención**

Los inventores hicieron la observación de que es posible detectar y cuantificar la  $\alpha$ -Hb libre en una muestra de sangre. Esta observación les condujo a encontrar que tal detección y cuantificación son útiles para diagnosticar, estadificar y/o hacer seguimiento de un trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite puesto que se demostró que cuanto mayor es el valor del conjunto de  $\alpha$ -Hb libre, más grave es el trastorno de hemoglobina. Además, se debería indicar que el método según la invención también puede ser útil para identificar nuevas mutaciones en genes de globina puesto que altos niveles de conjunto de  $\alpha$ -Hb libre son indicativos de la presencia de mutaciones. Por lo tanto, si se identifica mutación no conocida después de la genotipificación, se incita a que un experto en la técnica busque tales nuevas mutaciones.

**Definición:**

Tal como se usa en el presente documento, el término " $\alpha$ -Hb" se refiere a una proteína de 141 aminoácidos también llamada hemoglobina, alfa 1 (HBA1), cadena de alfa globina o cadena alfa. La proteína  $\alpha$ -Hb corresponde a un número de acceso de GenBank NP\_000549. Normalmente, en sujetos sanos, la hemoglobina humana adulta (Hb A) consiste en cuatro subunidades de proteína, dos subunidades llamadas alfa hemoglobina y dos subunidades llamadas beta hemoglobina.

Tal como se usa en el presente documento, los términos " $\alpha$ -Hb libre" o "conjunto de  $\alpha$ -Hb libre" corresponden a las cadenas de alfa globina (o monómeros) que no están unidas a beta hemoglobina en glóbulos rojos o reticulocitos, pero se podrían unir a AHSP. Por tanto,  $\alpha$ -Hb libre corresponde al exceso relativo de cadenas de alfa globina que no se unen a las membranas de los glóbulos rojos o no se agregan (cuerpos de inclusión). En la  $\beta$ -talasemia, se ha mostrado conveniente que los cuerpos de inclusión consistan solamente en cadena de  $\alpha$  globina que tienen alguna hematina unida en forma de hemicromos (Fessas y col., 1996).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "Proteína Estabilizante de la Alfa Hemoglobina" o "AHSP" se refiere a una proteína de 102 aminoácidos que está altamente conservada en humanos, cerdos, vacas y ratas. AHSP también a veces se refiere en la técnica como Factor Relacionado con la Diferenciación Eritroide (EDRF), o Factor Asociado a Eritroide (ERAF). El número de acceso de Genbank para AHSP incluye *Homo sapiens*, Número de Acceso AF485325. AHSP también puede referirse a una AHSP mutante con mayor afinidad para  $\alpha$ -Hb que AHSP nativa.

Tal como se usa en el presente documento, "detectar" significa determinar si  $\alpha$ -Hb libre está presente o no en una muestra biológica y "cuantificar" significa determinar la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra biológica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "trastorno relacionado con hemoglobina" se refiere a cualquier trastorno que se caracteriza por un desequilibrio en la síntesis de las cadenas de hemoglobina y particularmente por un exceso en  $\alpha$ -Hb.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente un sujeto según la invención es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína capaz de unirse específicamente a un antígeno, generalmente y preferiblemente unirse a un epítipo o determinante antigénico o dicho antígeno. El término "anticuerpo" también incluye proteínas recombinantes que comprenden los dominios de unión, así como variantes y fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

**La invención:**

Un primer aspecto de la invención es un método para diagnosticar y/o estadificar un trastorno relacionado con hemoglobina que lo necesite.

Según este primer aspecto, dicho método comprende las siguientes etapas de:

- poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con una pareja de unión específica a alfa hemoglobina ( $\alpha$ -Hb) seleccionada entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (AHSP), beta hemoglobina ( $\beta$ -Hb) y un anticuerpo que se une específicamente a  $\alpha$ -Hb,
- detectar y/o cuantificar la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre en dicha muestra biológica, y
- correlacionar dicha cantidad de  $\alpha$ -Hb libre con el diagnóstico y/o la estadificación de un trastorno relacionado con hemoglobina en dicho sujeto,

siendo el trastorno relacionado con hemoglobina seleccionado entre  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómicas, anemia, anemia falciforme, variantes de Hb inestables o persistencia hereditaria de Hb fetal.

5 La cantidad de  $\alpha$ -Hb libre cuantificada así se puede comparar con la correspondiente cantidad detectada en las muestras de sujetos control, en anteriores muestras obtenidas del sujeto o con valores normales de referencia.

Aunque el método de la invención está dirigido al diagnóstico de un trastorno relacionado con hemoglobina, los sujetos controles son, por ejemplo, sujetos que no han sido diagnosticado para dicho trastorno relacionado con hemoglobina. Los valores de referencia normales se refieren a la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre que se puede determinar por el método de la invención en un sujeto que no ha sido diagnosticado para un trastorno relacionado con hemoglobina.

10 En una realización de la invención, dicho valor control o valor de referencia se determina usando los valores promedios obtenidos a partir de al menos 10, preferiblemente a partir de al menos 100 sujetos controles.

15 Cuantificar la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre también es de interés para el seguimiento, por ejemplo, de un tratamiento terapéutico frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina tal como, por ejemplo, un tratamiento con hierro, cobalamina, eritropoyetina o cualquier agente estimulador de la síntesis de la cadena  $\gamma$ .

20 Por tanto, un segundo aspecto de la invención es un método para hacer un seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite.

Según este segundo aspecto, dicho método comprende las siguientes etapas de:

- 25
- poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho sujeto con una pareja de unión específica a alfa hemoglobina ( $\alpha$ -Hb) seleccionada entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (AHSP), beta hemoglobina ( $\beta$ -Hb) y un anticuerpo que se une específicamente a  $\alpha$ -Hb,
  - 30 - detectar y/o cuantificar la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre en dicha muestra biológica, y
  - correlacionar dicha cantidad de  $\alpha$ -Hb libre con el seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina en dicho sujeto,

35 siendo el trastorno relacionado con hemoglobina seleccionado entre  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómicas, anemia, anemia falciforme, variantes de Hb inestables o persistencia hereditaria de Hb fetal.

40 Según la invención, la muestra biológica susceptible a contener  $\alpha$ -Hb libre es una muestra biológica, tal como lisados celulares (hemolizado o lisado de tejidos hematopoyéticos heterotópicos u ortotópicos tales como médula ósea, hígado fetal o bazo) o es un fluido corporal tal como suero, plasma, sangre completa o sangre de cordón.

En una realización, dicha muestra biológica es sangre completa.

45 En otra realización, dicha muestra biológica es un hemolizado de eritrocitos. Ejemplo de dicho hemolizado de eritrocitos es un hemolizado de reticulocito y glóbulo rojo.

Según la invención, dicho trastorno relacionado con hemoglobina es  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómica, formas adquiridas de  $\beta$ -talasemia, anemia, anemia falciforme o variantes de Hb inestables y persistencia hereditaria de Hb fetal.

50 En una realización, dicho trastorno relacionado con hemoglobina es  $\beta$ -talasemia.

55 En otra realización, dicho trastorno relacionado con hemoglobina es un trastorno que conduce a un desequilibrio en la síntesis de las cadenas de hemoglobina que no es hereditario, tal como, por ejemplo, hipertiroidismo o alguna infección vírica crónica.

60 Según la invención, dicho tratamiento terapéutico frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina es un tratamiento con hierro, eritropoyetina, cobalamina o cualquier agente estimulador de la síntesis de la cadena  $\gamma$ .

65 En otra realización, el método según la invención es útil para hacer un seguimiento de los efectos secundarios de un tratamiento en el equilibrio en la síntesis de las cadenas de hemoglobina. Ejemplos de dichos tratamientos que muestran efectos secundarios, incluyen, pero no se limitan a, hormona tiroidea, fármacos antineoplásicos tales como hidroxiaurea (hidroxycarbamida) y folatos o fármacos antiviricos.

El método según la invención también es útil para hacer un seguimiento del grado clínico y la eficacia de tratamiento de enfermedades víricas crónicas conocidas por modificar la expresión de Hb A<sub>2</sub> y Hb F así como la razón de cadena de globina biosintética, estando posiblemente la magnitud de los cambios relacionados correlacionada con la gravedad de la infección pero también con el efecto celular del hipertiroidismo o la administración de la hormona tiroidea.

Según la invención, la pareja de unión específica a α-Hb susceptible de ser usada se selecciona entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (ASHP) y beta hemoglobina (β-Hb) y un anticuerpo que se une específicamente a α-Hb.

Anticuerpos útiles en las diversas realizaciones de la invención abarcan anticuerpos comercialmente disponibles y fragmentos de anticuerpo, así como algunos anticuerpos novedosos generados para unirse a un epítipo adecuado sobre α-Hb. Los anticuerpos usados en diversas realizaciones ilustrados en el presente documento son monoclonales o policlonales en la naturaleza. Otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos Fab o Fv también son útiles.

Ejemplos de dichos anticuerpos dirigidos a un epítipo sobre α-Hb incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo policlonal anti-Hb α (referencia P69905 de Millipore; referencia ab19191 de abcam), y los anticuerpos anti-Hb α monoclonales obtenidos a partir de una α-Hb recombinante parcial (aminoácidos 32 a 141) con etiqueta (*tag*) GST (referencia WH0003039M2 de SigmaAldrich; referencia H00003039-Q01 de Abnova).

En una realización, dicha pareja de unión específica a α-Hb es AHSP.

En una realización preferida, la AHSP se produce por modificación por ingeniería genética como una proteína de fusión con glutatión S transferasa (GST). La AHSP se puede expresar con otros sistemas de expresión de gen de fusión. Ejemplo de sistemas de expresión de gen de fusión incluyen, tioredoxina, Proteína de Unión a Maltosa (MBP), Proteína Fluorescente Verde (GFP), Proteína Fluorescente Amarilla (YFP), inteína, NusA o luciferasa como proteínas de fusión. La AHSP también se puede expresar con la etiqueta de polipéptido de proteína tal como etiqueta de polihistidina, Strep-Tag, Etiqueta FLAG, Etiqueta S, Etiqueta Dsb A, Etiqueta Dsb C, Etiqueta de hemaglutinina (Etiqueta HA) o Etiqueta myc.

En una realización de la invención, la detección y/o cuantificación de la α-Hb libre se lleva a cabo por fotometría.

En una realización preferida, la detección y/o cuantificación de la α-Hb libre se lleva a cabo por espectrometría.

Según la invención, dicha pareja de unión específica a α-Hb puede revestir directa o indirectamente un soporte sólido, comprendiendo dicho soporte sólido una superficie de unión de proteína tal como una placa de microtitulación, una partícula de metal coloidal, una partícula de óxido de hierro, una partícula de látex o una perla polimérica o una columna tal como una columna Microspin de GST (GST SpinTrap, GE Healthcare, Lifescience) o una columna de perla de níquel o cualquier soporte de afinidad que reconozca específicamente la Etiqueta o el resto de fusión.

En una realización particular, la pareja de unión específica a α-Hb que reviste un soporte sólido es GST-AHSP. Según esta realización, se eluyó la α-Hb unida a GST-AHSP fijada sobre la columna Microspin de GST y se midió la cantidad de α-Hb retenida calculando la cantidad de α-Hb libre en la muestra biológica.

En esta realización, el método para diagnosticar y/o estadificar un trastorno relacionado con hemoglobina o el método para hacer un seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto en necesidad se realiza:

- poniendo en contacto dicha muestra biológica con GST-AHSP fijada sobre columna Microspin de GST,
- eluyendo la α-Hb (formando complejo con GST-AHSP) así retenida, y
- calculando la cantidad de α-Hb libre en la muestra biológica.

La cantidad de cadenas de Hb se determinan por absorbancia, puesto que la concentración (c) se da mediante  $c = A \times 1 / \epsilon$  en donde A es la absorbancia observada (en do), 1 es el paso óptico, y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción unidades por M por cm. Generalmente se usan la A y  $\epsilon$  a 415 nm, estando cerca del pico de la banda de Soret.

En una realización, la cantidad de α-Hb unida a GST-AHSP obtenida después de la elución se calcula en mg de α-Hb unida/ml de hemolizado según la ecuación 1:

$$\frac{A_{413} \times MM1 \times v1}{\epsilon_{413}} \quad (\text{ecuación 1})$$

La cantidad de subunidades totales contenidas en el hemolizado se calcula en mg de subunidades/ml de hemolizado según la ecuación 2:

$$\frac{A_{415} \times MM2 \times v2}{\epsilon_{415}} \quad (\text{ecuación 2})$$

5

en la que  $A_{413}$  y  $A_{415}$  son la absorbancia,  
 $\epsilon_{413}$  y  $\epsilon_{415}$  son un coeficiente de extinción ( $125679 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^1$  y  $125\ 000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^1$ , respectivamente),  
 MM1 es la masa molecular de la subunidad  $\alpha$ -Hb (15744 Da)  
 MM2 es la masa molecular de las subunidades (16115 Da),  
 v1 es el volumen de elución de la  $\alpha$ -Hb unida a GST-ASHP expresado en ml, y  
 v2 es el factor de dilución del hemolizado usado para el ensayo de Hb.

10

Por tanto, la cantidad de mg de  $\alpha$ -Hb unida a la columna Microspin de GST por mg de subunidades en un ml de hemolizado es la razón ecuación 1/ecuación 2.

15

Además, considerando tanto que la MM1 y MM2 son similares, como que, en segundo lugar,  $\epsilon_{415}$  y  $\epsilon_{413}$  también son similares, la razón ecuación 1/ecuación 2 se puede simplificar. Indicar que los valores de  $\epsilon$  son similares para el complejo  $\alpha$ -Hb-AHSP y el promedio de las cadenas de Hb, pero no idénticos; un cálculo exacto requeriría los valores específicos. Si uno prefiere calcular la cantidad en masa, en lugar de concentración, entonces se requieren los valores específicos de la MM (masa molecular) de las subunidades de Hb.

20

Resulta que la cantidad de mg de  $\alpha$ -Hb unida/mg de subunidades/ml de hemolizado se calcula según la ecuación 3:

$$\frac{A_{415}^1 \times v1}{A_{415}^2 \times v2} \quad (\text{ecuación 3})$$

25

En una realización preferida, se aplicaron 0,500 ml de hemolizado sobre columna Microspin y la  $\alpha$ -Hb unida a GST-AHSP se recuperó en 0,200 ml de tampón eluido. Para informar de la cantidad por ml de hemolizado, v1 es igual a 0,2x2 es decir 0,4. La concentración de subunidades totales contenidas en el hemolizado se midió después de una dilución 1:400, v2 es igual a 400. La razón v1/v2 es igual a 1/1.000.

30

Por lo tanto, después de la simplificación de la ecuación 3, se calcula la cantidad de  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -Hb unida/mg de subunidades/ml de hemolizado según la ecuación 4:

$$\frac{A_{415}^1}{A_{415}^2} \quad (\text{ecuación 4})$$

35

Por tanto, un único informe de absorbancia es suficiente en nuestro experimento para obtener la cantidad en  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -Hb libre según la cantidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -Hb total (en base a hematina) contenida en un ml de hemolizado. La cantidad obtenida de  $\alpha$ -Hb libre detectada con el ensayo oscila desde 0,010  $\mu\text{g}/\text{mg}$  a 0,85  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Para facilitar la comparación de diferentes cantidades obtenidas, la  $\alpha$ -Hb libre se da en ng/mg, es decir, ppm.

40

En otra realización, la fracción de cadenas de  $\alpha$ -Hb libres en relación al número total de todas las cadenas de Hb (f) se calcula según la siguiente Fórmula 1:

$$(f) = [A(\alpha\text{-Hb}) / A(\text{Hb total})] * s * d \quad (\text{Fórmula 1})$$

45

en la que A es la absorbancia y s y d son unos factores de corrección para tener en cuenta algunas diferencias en los coeficientes de dilución (d) o absorción (s). Para experimento típico, el factor de dilución d y s es aproximadamente 1.

50

Las unidades de ppm ( $f \times 1.000.000$ ) o % ( $f \times 100$ ) son apropiadas en este caso:

- un valor de ppm inferior a 150 es indicativo de que dicho paciente no está afectado por un trastorno relacionado con hemoglobina, excepto la  $\alpha$ -talasemia;
- un valor de ppm comprendido entre 150 y 400/450 ppm es indicativo de que dicho paciente está afectado por trastorno relacionado con hemoglobina moderado en el que hay un relativo defecto de la síntesis de la cadena de  $\alpha$  a  $\beta$  globina; y
- un valor de ppm superior a 450 es indicativo de que dicho paciente está afectado por una  $\beta$ -talasemia clínicamente significativa, un trastorno relacionado con la hemoglobina grave.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "ppm" corresponde a la fracción de  $\alpha$ -Hb libre en relación a las subunidades de Hb totales. Por tanto, un valor correspondiente a 80 ppm corresponde a 0,008 % de  $\alpha$ -hub libre en relación a las subunidades Hb totales, equivalente a una cantidad capturada de 80 ng de  $\alpha$ -Hb libre por mg de Hb total.

10 En otra realización, la detección y/o cuantificación de la  $\alpha$ -Hb libre se lleva a cabo por detección inmunológica.

15 En una realización, la detección o cuantificación inmunológica del conjunto de  $\alpha$ -Hb libre se realiza mediante algunos métodos conocidos en la técnica usando al menos un anticuerpo que se une específicamente a  $\alpha$ -Hb.

20 Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas estándares tales como transferencias tipo western, ensayo de inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayo tipo "sándwich", reacción de precipitación por difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, reacción de precipitación, ensayo de aglutinación (tal como ensayo de aglutinación en gel, ensayo de hemaglutinación, etc.), ensayo de fijación de complemento, ensayo de proteína A, ensayo de inmunoelectroforesis, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de exclusión por tamaño, afinidad en fase sólida, etc.

25 Según la invención, un anticuerpo que se une específicamente a  $\alpha$ -Hb es un anticuerpo que no tiene reacción cruzada con otras hemoglobinas tales como  $\beta$ -hub.

30 Ejemplos de dicho anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo policlonal anti-Hb  $\alpha$  (referencia P69905 de Millipore; referencia ab19191 de abcam), y los anticuerpos anti- $\alpha$ -Hb monoclonales obtenidos de una  $\alpha$ -Hb recombinante parcial (aminoácidos 32 a 141) con etiqueta GST (WH0003039M2 de Sigma-Aldrich; H00003039-Q01 de Abnova).

35 Según la invención, el anticuerpo que específicamente se une a  $\alpha$ -Hb puede estar marcado con una molécula o sustancia detectable. Ejemplos de marcadores adecuados para este fin incluyen un agente quimioluminiscente, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un sustrato de una reacción enzimática, un agente fluorescente. El marcador se puede acoplar directa o indirectamente mediante cualquier método conocido en la técnica.

40 En otra realización de la invención, la cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra biológica se puede realizar mediante la técnica de fotólisis de destello (*flash*). La  $\alpha$ -Hb, atrapada por AHSP u otra molécula, se puede someter a fotodisociación. El cambio resuelto en tiempo en la absorción puede proporcionar tanto la cantidad como la información sobre el tipo de hemoproteína que está atrapada. Por ejemplo, se podría distinguir el tipo de cadena o una contaminación por hematina libre.

45 En una realización, la detección o cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra se puede realizar mediante un sistema de micromatriz de proteína, en el que el anticuerpo que específicamente se une a  $\alpha$ -Hb reviste directa o indirectamente una micromatriz de proteína. La muestra a ensayar se marca mediante biotilación *in vitro*. La  $\alpha$ -Hb libre biotilada atrapada sobre la matriz, a continuación, se detecta por avidina o estreptavidina que se une fuertemente a biotina. Si la avidina está conjugada con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina, la  $\alpha$ -Hb libre capturada se puede visualizar por la luminiscencia química aumentada. La cantidad de proteína unida al anticuerpo que específicamente se une a  $\alpha$ -Hb representa el nivel de  $\alpha$ -Hb libre en la muestra. Otros métodos, como tinción inmunológica, resonancia de plasmón de superficie, desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo, también se pueden usar para detectar las proteínas capturadas.

50 En otra realización de la invención, la detección o cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra se puede realizar mediante un sistema de matriz de perla citométrica en el que el anticuerpo que específicamente se une a  $\alpha$ -Hb reviste directa o indirectamente perlas.

55 En otra realización de la invención, la detección o cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra biológica se puede realizar mediante un inmunoensayo competitivo.

60 Ejemplos de inmunoensayos competitivos incluyen inmunoensayo de enzima o inmunoensayo ligado a enzima (EIA o ELISA), inmunoensayo fluorescente, ensayo de separación magnética (MSA), ensayo de flujo lateral, inmunoensayo de difusión o inmunoensayo de inmunoprecipitación.



En un ejemplo de inmunoensayo competitivo, la cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre se realiza:

- combinando una muestra que contiene  $\alpha$ -Hb libre con una cantidad conocida de una  $\alpha$ -Hb marcada para crear una muestra enriquecida,
- 5 - uniendo  $\alpha$ -Hb libre marcada y no marcada en la muestra enriquecida con un anticuerpo anti- $\alpha$ -Hb, en la que el anticuerpo se une específicamente a  $\alpha$ -Hb para crear complejos y a  $\alpha$ -Hb marcada para crear complejos marcados,
- midiendo la cantidad de complejo marcado
- calculando la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra.

10 En una realización, dicho anticuerpo que específicamente se une a  $\alpha$ -Hb puede revestir un soporte sólido, comprendiendo dicho soporte sólido una superficie de unión de proteína tal como una placa de microtitulación, una partícula de metal coloidal, una partícula de óxido de hierro, una partícula de látex o una perla polimérica.

15 En una realización, la  $\alpha$ -Hb marcada puede comprender un marcador tal como un agente quimioluminiscente, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima o un agente fluorescente. Ejemplos de agente quimioluminiscente incluyen una enzima que produce una señal quimioluminiscente en presencia de un sustrato(s) que produce energía quimioluminiscente cuando reacciona con la enzima. Ejemplos de tal enzima incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Otros ejemplos de un agente quimioluminiscente incluyen un marcador quimioluminiscente directo no enzimático, tal como el sistema de éster de Acridinio. Ejemplos de un agente colorimétrico incluyen una enzima tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y acetilcolinesterasa (AChE). Ejemplos de agente de transferencia de energía incluyen quelatos de lantánido fluorescentes. Ejemplos de agentes fluorescentes incluyen tintes fluorescentes.

25 Mientras que la muestra enriquecida se incuba con el anticuerpo que se une a  $\alpha$ -Hb, la  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra y la  $\alpha$ -Hb marcada añadida compiten por unirse al anticuerpo. Entonces, la  $\alpha$ -Hb marcada será capaz de unirse al anticuerpo dependiendo de la concentración relativa de la  $\alpha$ -Hb libre no marcada presente en la muestra. Por tanto, cuando se mide la cantidad de  $\alpha$ -Hb marcada, es inversamente proporcional a la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre no marcada presente en la muestra. A continuación, la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra, se puede calcular basándose en la cantidad de  $\alpha$ -Hb marcada medida, usando técnicas estándares.

30 En otro ejemplo del inmunoensayo competitivo, la cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre se realiza mediante el anticuerpo acoplado a o conjugado con un ligando, uniéndose dicho ligando a un anticuerpo adicional añadido a la muestra. Un ejemplo de dicho ligando es fluoresceína. El anticuerpo adicional se puede unir a un soporte sólido. En este ejemplo de inmunoensayo competitivo, el anticuerpo adicional se une al ligando acoplado al anticuerpo que se une sucesivamente a (i)  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra y (ii)  $\alpha$ -Hb marcada añadida a la muestra. Dicho complejo de masa formado permite el aislamiento y medición de la señal generada por el marcador acoplado a la  $\alpha$ -Hb marcada.

40 En otro ejemplo de inmunoensayo competitivo,  $\alpha$ -Hb puede estar unida a un soporte sólido, y se incuba con (i) un anticuerpo que se une a  $\alpha$ -Hb y (ii) una muestra que contiene la  $\alpha$ -Hb libre a medir. El anticuerpo se une o bien a la  $\alpha$ -Hb unida al soporte sólido o a la  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra, en proporción relativa dependiendo de la concentración de la  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra. El anticuerpo que se une a  $\alpha$ -Hb unida al soporte sólido, a continuación, se une a otro anticuerpo que está acoplado a un marcador. A continuación, se detecta la cantidad de señal generada a partir del marcador para medir la cantidad de  $\alpha$ -Hb. Tal medición será inversamente proporcional a la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre presente en la muestra. Tal ensayo se puede usar en una placa de microtitulación.

45 En otro ejemplo de inmunoensayo competitivo, la  $\alpha$ -Hb libre a medir compete con la  $\alpha$ -Hb que está unida a una primera partícula de soporte sólido, tal como Ficoll, por el anticuerpo que está unido a o reviste una segunda partícula de soporte sólido. Se da unión cruzada o aglutinación entre las partículas y forma masas de entramado de aglutinación conjunta. La cantidad de aglutinación se puede medir usando técnicas estándares, tales como espectrofotometría.

50 En otra realización de la invención, la cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra biológica se puede realizar mediante un inmunoensayo no competitivo referido como inmunométrico, inmunoensayos de "dos sitios" o tipo "sándwich", en los que la  $\alpha$ -Hb libre puede estar unida a o intercalada entre dos anticuerpos que específicamente se unen a  $\alpha$ -Hb.

55 Ejemplos de inmunoensayos no competitivos incluyen inmunoensayo de enzima o inmunoensayo ligado a enzima (EIA o ELISA), inmunoensayo fluorescente, ensayo de separación magnética (MSA), ensayo de flujo lateral, inmunoensayo de difusión, inmunoensayo de inmunoprecipitación, inmunoabsorbente o ensayo "bajo antígeno" (*antigen-down*) usando anticuerpos que se unen a  $\alpha$ -Hb unida a un soporte sólido, o ensayo de aglutinación.

En esta realización, la cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra biológica se realiza

- 65 - poniendo en contacto dicha muestra con dos anticuerpos que se unen a  $\alpha$ -Hb,
- midiendo la cantidad de anticuerpo anti- $\alpha$ -Hb unido y

- calculando la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre en la muestra biológica.

En una realización de la invención, el primer anticuerpo que se une a  $\alpha$ -Hb es un anticuerpo dirigido a un epítipo en un primer dominio de  $\alpha$ -Hb y el segundo anticuerpo es un anticuerpo dirigido a otro epítipo en un segundo dominio de  $\alpha$ -Hb.

En una realización, es útil un ensayo en una etapa (incubación simultánea de los dos anticuerpos que se unen a  $\alpha$ -Hb). En otra realización, es útil un ensayo en dos etapas (incubación secuencial de los dos anticuerpos que se unen a  $\alpha$ -Hb). Se prefiere un ensayo en dos etapas en el caso en el que otras moléculas pudieran competir por unirse a los anticuerpos que se unen a  $\alpha$ -Hb.

En una realización, un anticuerpo que se une a  $\alpha$ -Hb es el anticuerpo de "captura", y está unido a un soporte sólido, tal como superficie de acoplamiento a proteína o de unión a proteína, partículas de metal coloidales, partículas de óxido de hierro, o perlas poliméricas. Un ejemplo de perlas poliméricas es una partícula de látex. En tal realización, el anticuerpo de captura está unido a o reviste un soporte de fase sólida usando métodos de unión no covalentes o covalentes estándares, dependiendo de los requerimientos analíticos y/o de separación de fase sólida requeridos. El soporte sólido puede ser en forma de tubos de ensayo, perlas, micropartículas, papel de filtro, membrana, filtros de vidrio, partículas magnéticas, chips de vidrio o silicio u otros materiales conocidos en la técnica. El uso de micropartículas, particularmente partículas magnetizables, que se han revestido directamente con el anticuerpo o partículas que se han marcado con un aglutinante universal (tal como avidina o anticuerpo antiespecie) es útil para acortar significativamente el tiempo de incubación del ensayo.

Alternativamente, el anticuerpo anti- $\alpha$ -Hb de captura puede estar acoplado a un ligando que se reconoce mediante un anticuerpo adicional que está unido a o reviste el soporte sólido. La unión del anticuerpo de captura al anticuerpo adicional por el ligando, a continuación, inmoviliza indirectamente el anticuerpo de captura sobre el soporte. Un ejemplo de tal ligando es fluoresceína. Alternativamente, también se puede detectar indirectamente la pareja de unión mediante un sistema de detección secundario. Dicho sistema de detección secundario se basa en varios principios diferentes conocidos en la técnica tal como el reconocimiento de anticuerpo y otras formas de unión inmunológica o no inmunológica y sistemas de detección de amplificación de señal (por ejemplo, el sistema de biotina-estreptavidina). Cuando se usa un sistema de amplificación de señal, el marcador incluye una primera proteína tal como biotina acoplada al anticuerpo de captura, y una segunda proteína tal como estreptavidina que está acoplada a una enzima. La segunda proteína se une a la primera proteína. La enzima produce una señal detectable cuando se proporciona sustrato(s), de manera que la cantidad de la señal medida corresponde a la cantidad de pareja de unión que está unida a  $\alpha$ -Hb. Ejemplos de enzimas incluyen, sin limitación, fosfatasa alcalina, amilasa, luciferasa, catalasa, beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, peroxidasa de rábano picante, lactamasa, ureasa y malato deshidrogenasa. Sustratos adecuados incluyen, sin limitación, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), OPD (o-fenilendiamina), y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). El planteamiento de amplificación de señal se puede usar para incrementar significativamente la sensibilidad del ensayo y la reproducibilidad y realización a bajo nivel.

Anticuerpos útiles en las diversas realizaciones de la invención abarcan anticuerpos comercialmente disponibles y fragmentos de anticuerpo, así como algunos anticuerpos novedosos generados para unirse a un epítipo adecuado sobre  $\alpha$ -Hb. Los anticuerpos usados en diversas realizaciones ilustrados en el presente documento son monoclonales o policlonales en la naturaleza. Otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos Fab o Fv también son útiles.

En otra realización la cuantificación de  $\alpha$ -Hb libre en una muestra biológica se puede realizar por fluorescencia homogénea resuelta en tiempo (HTRF).

Por ejemplo, un primer anticuerpo dirigido a un epítipo en un primer dominio de  $\alpha$ -Hb se acopla a un fluoróforo donante, tal como criptato de europio (Eu<sup>3+</sup> criptato) o Lumi4™-Tb (Tb<sup>2+</sup> criptato), y un segundo anticuerpo dirigido a un segundo dominio de  $\alpha$ -Hb se acopla a un aceptor tal como XL665, una alofococianina modificada.

Otro aspecto de la descripción es un kit para su uso en el método de la invención como se describió anteriormente en el presente documento, comprendiendo dicho kit, como elementos separados:

- un soporte sólido, y
- una pareja de unión específica a  $\alpha$ -Hb.

En una realización de la descripción, dicha pareja de unión específica a  $\alpha$ -Hb es AHSP.

En una realización preferida, ASHP está fusionada a GST.

En otra realización, dicha pareja de unión específica a  $\alpha$ -Hb reviste directa o indirectamente un soporte sólido, comprendiendo dicho soporte sólido una superficie de unión a proteína tal como una placa de microtitulación, una partícula de metal coloidal, una partícula de óxido de hierro, una partícula de látex o una perla polimérica o una

columna tal como una columna Microspin de GST o una columna de perla de níquel o cualquier soporte de afinidad que reconozca específicamente la Etiqueta o resto de fusión.

En una realización preferida de la descripción, dicho soporte sólido es una columna Microspin de GST.

En una realización preferida particular, GST-AHSP está fijada sobre columna Microspin de GST.

El kit también puede contener componentes adicionales opcionales para la realización del método de la invención. Tales componentes opcionales son, por ejemplo, recipientes, mezcladores, tampones, instrucciones para la realización del ensayo, marcadores, soportes y reactivos necesarios para la elución.

Los siguientes ejemplos se dan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención.

### Descripción de las figuras

#### Figura 1: Principio del ensayo de dosificación de $\alpha$ -Hb libre:

Después de la expresión y purificación, se unieron 400  $\mu$ g de GST-AHSP a la columna Microspin que contenía 50  $\mu$ l de Glutación Sefarosa 4B y, a continuación, se incubaron con hemolizados de pacientes para capturar la  $\alpha$ -Hb libre. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C bajo ligera agitación, la columna Microspin se lavó cinco veces con PBS (NaCl 150 Mm,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 Mm, pH 7,4) y se eluyeron las proteínas unidas por 200  $\mu$ l de tampón de glutación (glutación reducido 10 mM en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8,0). Se cuantificó la  $\alpha$ -Hb que contenía  $\alpha$  en la fracción de elución mediante espectrofotometría a 414 nm ( $\epsilon = 125 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) con un espectrofotómetro HP 8453. La cantidad total de subunidades de Hb en 1 ml de hemolizado también se determinó a 414 nm después de una dilución 1:400. Por tanto, la fracción de subunidades  $\alpha$  libres es simplemente la razón de la absorción de subunidades  $\alpha$  eluidas de la columna y la absorción de las subunidades totales de Hb y se presenta en ng/mg equivalente a ppm.

Se realizaron ensayos *in vitro* para algunos pacientes a partir de diferentes muestras de sangre y los valores medidos del conjunto de  $\alpha$ -Hb libre son consistentemente similares.

#### Figura 2: ensayo de dosificación de $\alpha$ -Hb libre aplicado a pacientes $\beta$ -talasémicos en comparación con pacientes que presentan diferentes patologías de hemoglobina y con pacientes sin anomalía de Hb (HbA):

Este estudio concierne a 66 pacientes (43 hombres y 23 mujeres; edad media,  $50 \pm 17$  años) que incluyen 20 pacientes  $\beta$ -talasémicos (12 hombres y 8 mujeres; edad media,  $39 \pm 15$  años), 7 pacientes SS o SC (4 hombres y 3 mujeres; edad media,  $36 \pm 9$  años), 4 pacientes SS/ $\alpha$ -thal (3 hombres y 1 mujer, edad media,  $39 \pm 8$  años) y 1 paciente de  $\alpha$  triplicada hombre (69 años), 6 pacientes  $\alpha$ -talasémicos (2 hombres y 5 mujeres; edad media,  $47 \pm 15$  años) y 28 pacientes con Hb A (grupo de referencia: 21 hombres y 7 mujeres; edad media,  $63 \pm 11$  años). La fracción observada de  $\alpha$ -Hb libre en relación a la Hb total (ambas subunidades) se expresa como ppm, equivalente a ng de  $\alpha$ -Hb libre por mg de subunidades ( $\alpha+\beta$ ) totales.

#### Figura 3: ensayo de dosificación de $\alpha$ -Hb libre aplicado a 20 pacientes $\beta$ -talasémicos agrupados por su genotipo de globina:

El número de pacientes estudiados está indicado por encima de cada genotipo. Para los 2 pacientes con  $\beta$ -thal homocigota, un paciente es  $\beta^+$ -thal y el otro es  $\beta^0$ -thal. En los 4 pacientes con  $\beta$ -thal/HbE, 1 paciente es  $\beta^+$ -thal y tres son  $\beta^0$ -thal. Los 3 pacientes con  $\beta^0$ -thal heterocigota asociada a una triplicación del gen  $\alpha$  pertenecen a la misma familia.

Las flechas indican el número de paciente 5 en la Tabla 1B.

#### Figura 4: Caracterización de las subunidades $\alpha$ en la fracción eluida por cinéticas de recombinación de CO después de fotodisociación:

Se midieron las cinéticas de recombinación bimolecular después de fotólisis de destello usando pulsos de láser YAG de 10 ns (Quantel, Les Ulis, Francia) a 532 nm. Las muestras estaban en cubetas de cuarzo de 4 x 10 mm con observación a 436 nm. Las mediciones eran a 25 °C en tampón de glutación, CO 100  $\mu$ M. En una segunda medición, se añadió  $\beta$ -Hb. A continuación, se añadió Hexafosfato de Inositol (IHP), un análogo del efector 2,3-Difosfoglicerato, a una concentración final de 1 mM para aumentar la fracción de Hb tetramérica en estado T.

#### Figura 5: Caracterización de las subunidades $\alpha$ en la fracción eluida por espectrofotometría:

En el presente documento se muestran dos casos: los espectros de absorción de  $\alpha$ -Hb ferrosa en la forma CO y el complejo  $\alpha$ -Hb/AHSP en la forma oxidada (His-Fe-His hexacoordinada).

**Ejemplo****Material y Métodos****5 Pacientes:**

Este estudio concierne a 66 pacientes (43 hombres y 23 mujeres) que incluyen 28 pacientes sin aparente trastorno de Hb (grupo de referencia) (21 hombres y 7 mujeres; edad media,  $63 \pm 11$  años), 20 pacientes  $\beta$ -talasémicos (12 hombres y 8 mujeres; edad media,  $39 \pm 15$  años), 6 pacientes  $\alpha$ -talasémicos (2 hombres y 4 mujeres; edad media,  $50 \pm 15$  años), 7 pacientes SS o SC (4 hombres y 3 mujeres; edad media,  $36 \pm 9$  años), 4 pacientes SS/ $\alpha$ -thal (3 hombres y 1 mujer, edad media,  $39 \pm 8$  años) y 1 paciente de  $\alpha$  triplicada hombre (69 años). Para los pacientes, excepto los controles sin aparente trastorno de Hb, se determinaron los genotipos de  $\beta$ - y  $\alpha$ -thal. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los participantes a este estudio según la declaración internacional de Helsinki y las normas éticas francesas.

**15 Investigaciones hematológicas y de genotipificación:**

Se recogieron muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA durante el muestreo rutinario para el actual seguimiento de sus condiciones clínicas. Se investigó el fenotipo de Hb por cromatografía de intercambio iónico (BioRad Variant II hemoglobin analyzer®). Los pacientes con Hb no aparente se muestrearon en el momento de una flebotomía programada para el tratamiento de sobrecarga de hierro. Todos ellos tenían su recuento de célula sanguínea y su determinación de ferritina en suero. Los pacientes con enfermedades infecciosas en curso o inflamatorias, distiroidismo o enfermedades víricas crónicas no estaban incluidos.

25 En todos los pacientes  $\beta$ - y  $\alpha$ -talasémicos, el ADN extraído de la sangre periférica y la genotipificación del locus de  $\beta$ -globina y el locus de  $\alpha$ -globina se hizo usando métodos convencionales (Rose y col. 2009).

**Reparación del hemolizado de glóbulos rojos, la proteína GST-AHSP y la  $\alpha$ -Hb:**

30 Los glóbulos rojos (RBC) se prepararon dentro de las 2 horas siguientes a la recogida de sangre. Se lavaron los RBC con NaCl 0,15 M y se sometieron a lisis por agua fría. Después de la centrifugación, se recuperó el lisado de glóbulo rojo y se mantuvo a  $-80$  °C.

35 La AHSP recombinante se expresó como proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) en *Escherichia coli* usando el plásmido de expresión pGEX-AHSP y se purificó como se describió previamente (Baudin-Creuzza y col. 2004).

La  $\alpha$ -Hb nativa se purificó a partir de Hb A como se describió previamente (Geraci y col. 1969 y Parkhurst y col. 1992).

**40 Ensayo de dosificación de  $\alpha$ -Hb libre in vitro:**

Se aplicaron quinientos  $\mu$ l de hemolizado o 500  $\mu$ g de  $\alpha$ -Hb nativa (control) sobre una columna Spin Trap™ de GST (Glutatión Sefarosa 4B, GE Healthcare, Life Science) sobre la cual se unieron 400  $\mu$ g de GST-AHSP. Después de la incubación y el lavado, se diluyeron la GST-AHSP y las proteínas unidas. La  $\alpha$ -Hb unida a GST-AHSP y la cantidad total de Hb ( $\alpha_2\beta_2$ ) contenida en hemolizado se cuantificaron por espectrofotometría a 414 nm. Por tanto, la fracción de  $\alpha$ -Hb libre es simplemente la razón de la absorción de  $\alpha$ -Hb eluida de la columna y la absorción de Hb total y se presenta en ng/mg o ppm. Para confirmar que las proteínas eluidas en la columna son  $\alpha$ -Hb, hicimos un seguimiento a 436 nm de las cinéticas de reunión de CO después de fotólisis de destello.

**50 Estudio in vitro competitivo:**

Para determinar si  $\alpha$ -Hb asociada con AHSP en el hemolizado podría interferir con nuestro ensayo, realizamos un ensayo *in vitro* competitivo. Después de la unión de GST-AHSP sobre la micro-columna, se añadió complejo AHSP/ $\alpha$ -Hb libre a equimolaridad en AHSP. Se recuperó la fracción a través del flujo, a continuación, se lavó la columna, y se eluyeron las proteínas unidas restantes. La  $\alpha$ -Hb contenida en las diferentes fracciones se determinó a 414 nm.

**60 Resultados**

65 En pacientes  $\beta$ -talasémicos, la  $\beta$ -globina defectuosa conduce a un desequilibrio en la síntesis de las cadenas de  $\alpha$ - y no  $\alpha$ -globina. Muchos estudios de la síntesis de Hb claramente mostraron que la síntesis de cadena  $\beta$  es significativamente menor que la síntesis de cadena  $\alpha$ . Puesto que el problema es el exceso de cadena  $\alpha$ , es apropiado cuantificar con exactitud la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre, pero hasta la fecha, no había más método para evaluar este parámetro. En este estudio, describimos un nuevo método para medir la cantidad de  $\alpha$ -Hb libre que se contiene en el hemolizado de pacientes  $\beta$ -talasémico usando la chaperona AHSP para atrapar las cadenas  $\alpha$  libres (Figura 1).

**Identificación de las proteínas unidas a GST-AHSP a partir de hemolizado de pacientes:**

Para confirmar que la proteína unida a GST-AHSP es  $\alpha$ -Hb, medimos las cinéticas de reunión de CO después de fotólisis de destello, puesto que el complejo AHSP/ $\alpha$ -Hb manifiesta un único índice "I", que es intermedio a los estados habituales R y T de Hb (Baudin-Creuzas y col., 2004). Las cinéticas de recombinación de CO del complejo eluido presentan una fase intermedia sencilla con el mismo índice "I" como se informó para  $\alpha$ -Hb en presencia de su chaperona (Figura 4). Después de la adición de  $\beta$ -Hb al complejo eluido, las cinéticas de recombinación llegan a ser bifásicas, con índices característicos de los estados alostéricos R y T de Hb tetramérica. Tal como se espera para la Hb tetramérica normal, IHP aumenta la cantidad de fase lenta (estado T). Las características de unión a ligando de la fracción eluida demuestra que la  $\alpha$ -Hb funcional estaba atrapada a AHSP y se puede transferir a  $\beta$ -Hb para formar Hb A con el correcto comportamiento alostérico (Figura 4). A continuación, cuantificamos las proteínas eluidas unidas a GST-AHSP mediante espectrofotometría a 414 nm (Figura 5). El espectro observado de la fracción de elución es idéntico al obtenido para  $\alpha$ -Hb en presencia de AHSP (con o sin GST), en nuestro caso el complejo GST-AHSP/ $\alpha$ -Hb.

**Definición de los términos " $\alpha$ -Hb libre":**

Se ha informado que la concentración de AHSP en precursores de RBC humanos era alrededor de 0,1 mM (Kihm y col. 2002). Así surge la cuestión de si el complejo AHSP/ $\alpha$ -Hb aún puede estar presente en el hemolizado y, si es así, si podría interferir con nuestro ensayo liberando  $\alpha$ -Hb durante su paso a través de la columna. Para responder a esta cuestión, dirigimos un estudio *in vitro* competitivo que mostró que el 20 % de  $\alpha$ -Hb dentro del complejo AHSP/ $\alpha$ -Hb se transfería a la AHSP unida a la columna. Estos resultados muestran que la AHSP unida a la columna puede atrapar tanto la  $\alpha$ -Hb libre como una fracción de  $\alpha$ -Hb dentro del complejo AHSP/ $\alpha$ -Hb en el hemolizado. Por tanto, los términos " $\alpha$ -Hb libre" o "conjunto de  $\alpha$ -Hb libre" corresponden a la  $\alpha$ -Hb que no se une a  $\beta$ -Hb en glóbulos rojos, pero podría estar unida a AHSP.

**Cuantificación del conjunto de  $\alpha$ -Hb libre a partir de los hemolizados de pacientes:**

Tal como se determinó a partir de 10 experimentos separados, la cantidad máxima de  $\alpha$ -Hb nativa que se une a GST-AHSP unida a columna Microspin era de  $99 \pm 11 \mu\text{g}$ .

El ensayo de dosificación de  $\alpha$ -Hb libre se aplicó a los hemolizados de 66 sujetos. La cantidad de  $\alpha$ -Hb libre capturada en relación a la cantidad total de Hb (ambas subunidades) aplicadas a la columna varía entre 29 y 1.756 ppm (ng de  $\alpha$ -Hb libre por mg de Hb total) (Figura 2).

En el hemolizado de los 28 pacientes sin anomalía de Hb, el cual se puede considerar como grupo de referencia, encontramos un valor promedio de aproximadamente  $93 \pm 21$  ppm de  $\alpha$ -Hb libre, con el valor límite más bajo a 62 ppm y el más alto a 134 ppm. Estos resultados están de acuerdo con aquellos que muestran la presencia de cadenas  $\alpha$  nuevamente sintetizadas libres en reticulocitos humanos normales.

En el caso de los 20 pacientes  $\beta$ -talasémicos, la fracción de  $\alpha$ -Hb libre en relación a las subunidades totales varió entre 119 y 1.756 ppm. La alta dispersión del nivel del conjunto de  $\alpha$ -Hb libre refleja el espectro clínico de esta patología que oscila desde formas asintomáticas a enfermedades graves. En nuestras series, cuando el conjunto de  $\alpha$ -Hb estaba por debajo de 140 ppm, el paciente no mostraba una  $\beta$ -talasemia sintomática. La gran variabilidad en la expresión fenotípica de la  $\beta$ -thal con frecuencia depende de la asociación del defecto de  $\beta$ -globina con otra anomalía de hemoglobina o de otro factor modulador. En la Tabla 1-A, los pacientes  $\beta$ -talasémicos se clasificaron en términos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -genotipos y valores hematológicos y en la Figura 3 el conjunto de  $\alpha$ -Hb libre está representado en relación a estos genotipos. El conjunto más alto de  $\alpha$ -Hb libre, 1.756 ppm, que corresponde a 20  $\mu\text{g}$  sin tener en cuenta la subunidad de Hb total en el hemolizado, se observó para un paciente con  $\beta^+$ -thal homocigota con un fenotipo intermedio de talasemia. Puesto que aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -Hb se podría unir a la columna, el valor máximo que se podría detectar está muy por encima de los valores alcanzados en patología. En tres de los cuatro pacientes con  $\beta$ -thal/HbE, la fracción de  $\alpha$ -Hb libre era mayor de 1.000 ppm. Por el contrario, el valor inferior encontrado para el cuarto paciente (525 ppm; paciente número 5 en la Tabla 1) se explicó por la presencia simultánea de una  $\alpha$ -thal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{3,7}$ ). Los valores intermedios se indicaron en el grupo formado por pacientes de  $\beta^+$ -thal heterocigota, pacientes de compuesto heterocigoto y el paciente de  $\beta^0$ -thal heterocigota asociado a una triplicación del gen  $\alpha$ . Valores bajos intermedios se observaron para pacientes que pertenecían al grupo de  $\beta^+$ -thal/Hb S o de  $\beta^0$ -thal heterocigota. El valor más bajo (119 ppm) se encontró para un paciente heterocigoto para Hb E asociada con una  $\alpha$ -thal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha^{3,7}$ ).

En el caso de los 6 pacientes con  $\alpha$ -thal (Tabla 1-B), la cantidad observada de  $\alpha$ -Hb libre estaba por debajo del grupo de referencia, generalmente entre 29 y 94 ppm con un promedio de 61 ppm  $\pm$  26 ppm. A partir de nuestros resultados claramente parece que la presencia de la  $\alpha$ -thal reduce significativamente el valor del conjunto de  $\alpha$ -Hb libre.

Para los 7 pacientes SS o SC, las cantidades de  $\alpha$ -Hb libre son más heterogéneas, entre 161 y 403 ppm con un promedio de  $237 \pm 99,8$  ppm (Figura 2).

Para los 4 pacientes SS/ $\alpha$ -thal, las cantidades de  $\alpha$ -Hb libre son intermedias entre las obtenidas con los pacientes SS o SC y los pacientes  $\alpha$ -talasémicos, con un promedio de 126 ppm  $\pm$  18,6 ppm.

- 5 Se ilustró la precisión de nuestro ensayo mediante dos pacientes que inicialmente se consideraron sin trastorno aparente de Hb y para los cuales se encontraron los valores de  $\alpha$ -Hb libre inferiores (33 ppm) y mayores (138 ppm) que los valores del grupo de referencia. La genotipificación de estos pacientes mostró que el primero llevaba una  $\alpha$ -thal ( $\alpha^{\text{ivs-5nt}} \alpha/\alpha$ , paciente 5 Tabla 1B), mientras que el segundo paciente tenía una triplicación del gen  $\alpha$ . Estos dos pacientes se retiraron del grupo control.
- 10 En conclusión, informamos de un método sensible y simple para detectar el conjunto de  $\alpha$ -Hb libre en pacientes con una  $\beta$ -talasemia. El conjunto de  $\alpha$ -Hb libre no solamente se correlaciona bien con la clasificación clínica de la  $\beta$ -talasemia estudiada, sino que puede proporcionar una escala más precisa de gravedad dentro de un genotipo dado. Por tanto, este ensayo puede servir para refinar el diagnóstico de formas empeoradas heterocigotas y para dar un criterio biológico para la mejor clasificación de  $\beta$ -talasemias intermedias. Además, el índice de  $\alpha$ -Hb libre separa
- 15 claramente los diversos tipos de hemoglobinopatías. Este ensayo también permitirá el seguimiento de la evolución del desequilibrio de la síntesis de Hb en respuesta a tratamientos, tal como con eritropoyetina recombinante, para hacer ajustes finos de la terapia. Más generalmente, este ensayo también se aplicará a todas las enfermedades con un desequilibrio de síntesis de globina.

Tabla 1. Características clínicas y biológicas de (A) pacientes  $\beta$ -talasémicos y (B) pacientes  $\alpha$ -talasémicos Tabla 1A

Paciente	Edad	Género	Categoría	Genotipo $\beta$	Genotipo $\alpha$	Reticulocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ (%)	Hb, g/dl	MC, fl*	MCH, pg**	Hb A %	Hb A <sub>2</sub> %	Otras Hb %	$\alpha$ -Hb libre ppm
1	38	F	$\beta^+$ -thal homoc	IVSI-6(T>C)/IVSI-6(T>C)	aa/aa	224 (6,1)	8,3	78,4	22,4	68,3	4,6	F: 13,1	1756
2	35	M	$\beta^0$ -thal / $\beta^0$ -thal	cd39(C>T)/IVS-II-1(G>A)	aa/aa	156 (5,3)	7,7	96,2	29,6	0	1,5	F: 98	962
3	29	F	$\beta^0$ -thal/ $\beta^E$	IVSII-654(C>T)/cd26(G>A)	aa/aa	243 (6)	7,8	81,3	24,1	0	na***	F: 57 E+A2:43,7	1304
4	21	M	$\beta^0$ -thal/ $\beta^E$	cd22(G>T)/cd26(G>A)	aa/aa	526 (13,5)	7,5	71,8	19,2	0	na	F: 28 E+A2:72	1184
5#	54	F	$\beta^0$ -thal/ $\beta^E$	cd17(A>T)/cd26(G>A)	$q^{3,7}/aa$	150 (3,1)	8,8	58,3	18,0	0	na	F: 20 F: 80	525
6#	52	M	$\beta^+$ -thal/ $\beta^E$	cd26(G>A)/-28(A>G)	aa/aa	147 (7,4)	8,1	63,4	19,8	21	na	F: 9,3 E+A2:69,7	1018
7	42	M	$\beta^+$ grave/ $\beta^+$ grave	IVSI-5(G>A)/IVS-1110(G>A)	aa/aa	164 (4,6)	10,6	97,2	29,4	6	1,5	F: 92,5	742
8#	28	F	$\beta^0/\beta^+$ -thal leve	IVSI-1(G>A)/-101(C>T)	aa/aa	165 (3,6)	9,2	63,0	20,0	82,5	6,5	F: 11	325
9#	37	M	$\beta^0$ -thal/ $\alpha$ triplicada	IVSI-I(G>A)/p <sup>A</sup>	aa/aaa	145 (3,1)	9,9	66,0	21,1	92,2	5,3	F: 2,5	714
10#	36	F	$\beta^0$ -thal/ $\alpha$ triplicada	IVSI-I(G>A)/ $\beta^A$	aa/aaa	206 (3,75)	11,2	63,6	20,4	90,9	5,1	F: 4	487
11#	62	M	$\beta^0$ -thal/ $\alpha$ triplicada	IVSI-I(G>A)/ $\beta^A$	aa/aaa	134 (2,6)	10,9	66,0	20,6	88,8	5,2	F: 6	485
12#	55	M	$\beta^+$ -thal heteroc	IVSII-654(C>T)/ $\beta^A$	aa/aa	112 (2,9)	8,1	66,7	20,8	88,4	5,2	F: 6,4	698
13#	24	M	$\beta^0$ -thal heteroc	cd6(-A)/ $\beta^A$	aa/aa	113 (3)	8,2	67,6	22,2	87,4	6,1	F: 6,5	284
14#	47	M	$\beta^0$ -thal heteroc	cd39(C>T)/ $\beta^A$	aa/aa	130 (2)	12,3	62,5	19,2	93,3	5,4	F: 1,3	373
15#	52	F	$\beta^0$ -thal heteroc	IVSI-I(G>A)/ $\beta^A$	aa/aa	120 (2,3)	11,0	64,2	20,8	92,4	5,2	F: 2,4	150
16#	31	M	$\beta^0$ -thal heteroc	IVSII-1(G>A)/ $\beta^S$	aa/ $\alpha^{3,7}$	212 (4,2)	11,0	68,6	21,6	0	4,1	F: 10,7 S: 85,3	178
17#	32	M	$\beta^+$ -thal/ $\beta^S$	$\delta\beta$ -Lepore/ $\beta^S$	aa/aa	107 (1,73)	14,5	71,2	23,9	1,8	na	F: 18,4 Lepore:10,3 S: 69,5	138
18	24	F	$\beta^+$ -thal/ $\beta^S$	-29(A>G)/ $\beta^S$	aa/aa	132 (2,7)	12,0	73,5	24,5	26	5	F: 5 S: 69	151
19#	31	F	$\beta^+$ -thal/ $\beta^S$	-29(A>G)/ $\beta^S$	aa/aa	152 (3,2)	11,4	74,5	24,3	24,5	6	F: 6,5 S: 69	141

Paciente	Edad	Género	Categoría	Genotipo $\beta$	Genotipo $\alpha$	Reticulocitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ (%)	Hb, g/dl	MC, fl*	MCH, pg**	Hb A %	Hb A <sub>2</sub> %	Otras Hb %	$\alpha$ -Hb libre ppm
20	81	M	$\beta^E/\beta^A$	cd26(G>A)/ $\beta^A$	$\alpha\alpha/\alpha^{3,7}$	21 (0,45)	12,1	78,7	25,7	71	na	F: 0,5 E+A2: 28,5	119



Tabla 1B

Paciente	Edad	Género	Genotipo β	Genotipo α	Reticulocitos x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> (%)	Hb, g/dl	MCV, fl*	MCH, pg**	Hb A <sub>2</sub> %	Otras Hb %	α-Hb libre ppm
1	57	F	β <sup>A</sup>	-α <sup>-3,7</sup> /--SEA	195 (3,75)	9,1	59,6	17,5	0,6	F: 0,8 H: 18	29
2	41	F	β <sup>A</sup>	α/-SEA	185 (3,94)	9,3	63,8	19,8	0,8	F: 2 H: 18	70
3	70	F	β <sup>A</sup>	αα/--SEA	118 (1,93)	13	68,9	21,3	1,9	F: 0,8	94
4 <sup>Δ</sup>	28	F	β <sup>A</sup>	αα/--	90 (1,67)	10,7	63	19,8	2,5	F: 0,7	78
5	58	M	β <sup>A</sup>	αα/αα <sup>1vs1-5nt</sup>	81 (1,21)	13,2	65,7	19,7	2	F: 0,3	33
6	44	M	β <sup>A</sup> cd26(G>A)	αα <sup>CS</sup> /--SEA	156 (2,84)	8,8	58,2	16		F: 1,6	62

Se investigó el fenotipo de Hb (Hb A, Hb A<sub>2</sub>, Hb F, Hb E, Hb S) mediante cromatografía de intercambio catiónico (BioRad Variant II hemoglobin analyzer® que usa el sistema de elución kit doble),  
# paciente sometido a esplenectomía  
\*MCV: volumen celular medio  
\*\*\*MCH: hemoglobina corpuscular media  
Δ Este paciente se encontró que era heterocigoto para una delección prolongada que separa desde Hs 40 a 3' del gen alfa 1 por Análisis de PCR de Ligación Múltiple (P140B kit, MRC Holland, Amsterdam, Países Bajos)

## Referencias

- Bank A., "AHSP: a novel hemoglobin helper". *J Clin Invest*. Julio de 2007; 117(7):1856-65.
- 5 Baudin-Creuzza, V., Vasseur-Godbillon, C., Pato, C., Préhu, C., Wajcman, H., Marden, M.C., 2004. "Transfer of human alpha to beta hemoglobin via its chaperon protein: evidence for a new state". *J. Biol. Chem.* 279, 36530-36533.
- Baudin-Creuzza V., Chauvierre C., Domingues E., Kiger L., Leclerc L., Vasseur C., Célier C., Marden M.C. 2008. "Octamers and nanoparticles as hemoglobin based blood substitutes". *BBA - Proteins and Proteomics*. 1784, 1448-1453.
- 10 Domingues, E., Brillet, T., Vasseur, C., Agier, V., Marden, M.C., Baudin-Creuzza, V." Construction of a new polycistronic vector for over-expression and rapid purification of human haemoglobin". *Plasmid*, 2009, 61, 71-77.
- Gell, D., Kong, Y., Eaton, S.A., Weiss, M.J., Mackay, J.P., 2002. "Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein alpha-hemoglobin stabilizing protein". *J. Biol. Chem.* 277, 40602-40609.
- 15 Geraci, G., Parkhurst, L. J., y Gibson, Q.H., 1969. "Preparation and properties of alpha- and beta-chains from human haemoglobin". *J. Biol. Chem.* 244, 4664-4667.
- Feng L., Gell D.A., Zhou S., Gu L., Kong Y., Li J., Hu M., Yan N., Lee C., Rich A.M., Armstrong R.S., Lay P.A., Gow A.J., Weiss M.J., Mackay J.P., Shi Y., 2004. "Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of alpha-hemoglobin". *Cell*. 119, 629-40.
- 20 Feng L., Zhou S., Gu L., Gell D.A., Mackay J.P., Weiss M.J., Gow A.J., Shi Y., 2005. "Structure of oxidized  $\alpha$ -haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem". *Nature*, 435, 697-701.
- Fessas, P., Loukopoulos, D., Kaltsoya, A., 1966. "Peptide analysis of the inclusions of erythroid cells in beta-thalassemia". *Biochim Biophys Acta*. 1966, 124, 430-2.
- Kim, H.C., Weierbach, R.G., Friedman, S., Schwartz, E., 1977, *Blood*. 49, 785-92.
- 25 Kihm, A.J., Kong, Y., Hong, W., Russel, J.E., Rouda, S., Adachi, K., Simon, M.C., Blobel, G.A., Weiss, M.J. 2002. "An abundant erythroid protein that stabilizes free  $\alpha$ -haemoglobin". *Nature* 417, 758-763.
- Parkhurst, K.M., y Parkhurst, L.J. 1992. "Rapid preparation of native alpha and beta chains of human haemoglobin". *Int. J. Biochem.* 24, 993-998.
- 30 Rose, C., Rossignol, J., Lambilliotte, A., Depret, S., Maboudou, P., Pissard S. 2009. "A novel ( $\epsilon,\gamma,\sigma,\beta$ ) (0)-thalassemia deletion associated with an alpha globin gene triplication leading to a severe transfusion dependant foetal thalassaemic syndrome". *Haematologica*, 94, 593-594.
- Thein, S.L. 2005. "Genetic modifiers of beta-thalassemia". *Haematologica*. 90, 649-60.
- Weatherall, D.J. 2004. "Thalassaemia: the long road from bedside to genome". *Nat Rev Genet*. 5, 625-31.
- Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Naughton, M.A. 1965. "Globin synthesis in thalassaemia: an in vitro study". *Nature*. 208, 1061-1065.
- 35 Weatherall, D. J., and Clegg, J. B. "The thalassaemia syndromes" (4<sup>o</sup> ed.) (2001) Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- 40 Yu X., Kong Y., Dore L.C., Abdulmalik O., Katein A.M., Zhou S., Choi J.K., Gell D., Mackay J.P., Gow A.J., Weiss M.J. "An erythroid chaperone that facilitates folding of alpha-globin subunits for hemoglobin synthesis". *J Clin Invest*. Julio 2007; 117(7): 1856-65.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diagnosticar y/o estadificar un trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método:

- 5
- poner en contacto una muestra biológica previamente obtenida de dicho sujeto con una pareja de unión específica a alfa hemoglobina ( $\alpha$ -Hb) seleccionada entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (AHSP) y beta hemoglobina ( $\beta$ -Hb),
  - detectar y/o cuantificar la presencia de  $\alpha$ -Hb libre en dicha muestra biológica, y
- 10
- correlacionar dicha cantidad de  $\alpha$ -Hb libre con el diagnóstico y/o la estadificación de un trastorno relacionado con hemoglobina en dicho sujeto,

siendo el trastorno relacionado con hemoglobina seleccionado entre  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómica, anemia, anemia falciforme, variantes de Hb inestables o persistencia de Hb fetal hereditaria.

15

2. Un método para hacer el seguimiento de un tratamiento frente a un trastorno relacionado con hemoglobina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método:

- 20
- poner en contacto una muestra biológica previamente obtenida de dicho sujeto con una pareja de unión específica a alfa hemoglobina ( $\alpha$ -Hb) seleccionada entre el grupo que consiste en Proteína Estabilizante de la Alfa-Hemoglobina (AHSP) y beta hemoglobina ( $\beta$ -Hb),
  - detectar y/o cuantificar la presencia de  $\alpha$ -Hb libre en dicha muestra biológica, y
  - correlacionar dicha cantidad de  $\alpha$ -Hb libre con el seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno
- 25
- relacionado con hemoglobina en dicho sujeto,

siendo el trastorno relacionado con hemoglobina seleccionado entre  $\beta$ -talasemia, incluyendo los síndromes relacionados con Hb E,  $\gamma$ -talasemia, afecciones de talasemia sindrómica, anemia, anemia falciforme, variantes de Hb inestables o persistencia de Hb fetal hereditaria.

30

3. El método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la detección y/o cuantificación de la  $\alpha$ -Hb libre se lleva a cabo por fotometría.

4. El método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la detección y/o cuantificación de la  $\alpha$ -Hb libre se lleva a cabo por detección inmunológica.

35

5. El método según la reivindicación 4, en la que la detección inmunológica de la  $\alpha$ -Hb libre se lleva a cabo usando al menos un anticuerpo que se une específicamente a  $\alpha$ -Hb.

6. El método según la reivindicación 3 o 4, en la que la detección inmunológica de la  $\alpha$ -Hb libre se lleva a cabo por un inmunoensayo de enzima o inmunoensayo ligado a enzima (EIA o ELISA).

40

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en la que la detección inmunológica de la  $\alpha$ -Hb libre se lleva a cabo por fluorescencia homogénea resuelta en tiempo (HTRF).

45

8. El método según la reivindicación 1 a 7, en la que dicho método es para diagnosticar, estadificar y/o hacer un seguimiento de una  $\beta$ -talasemia.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que dicho método es para hacer un seguimiento de un tratamiento frente a dicho trastorno relacionado con hemoglobina, siendo este un tratamiento con hierro, eritropoyetina, cobalamina o agente estimulante de la síntesis de cadena  $\gamma$ .

50

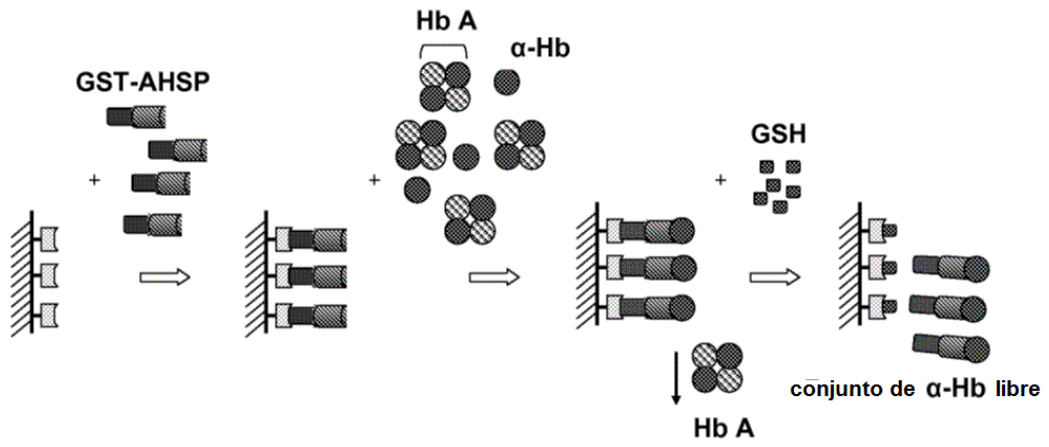


Figura 1

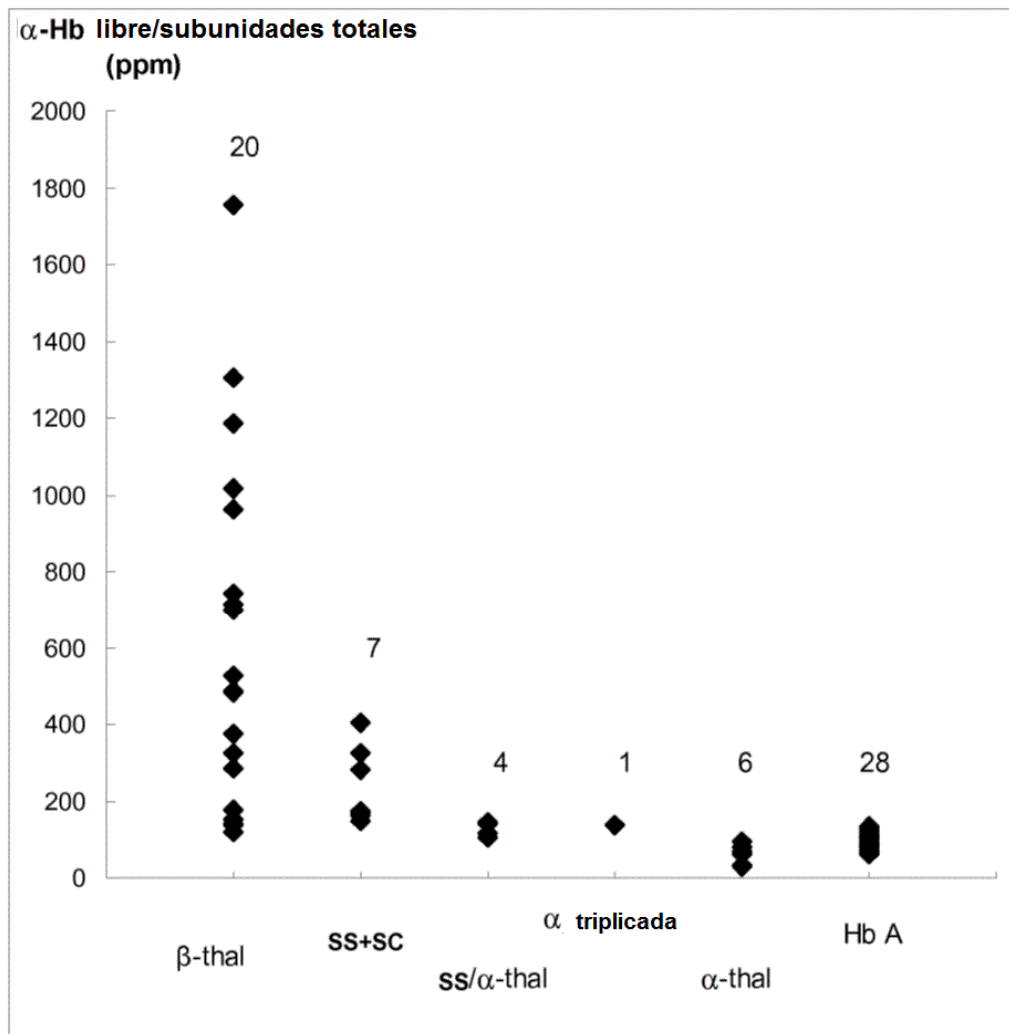


Figura 2

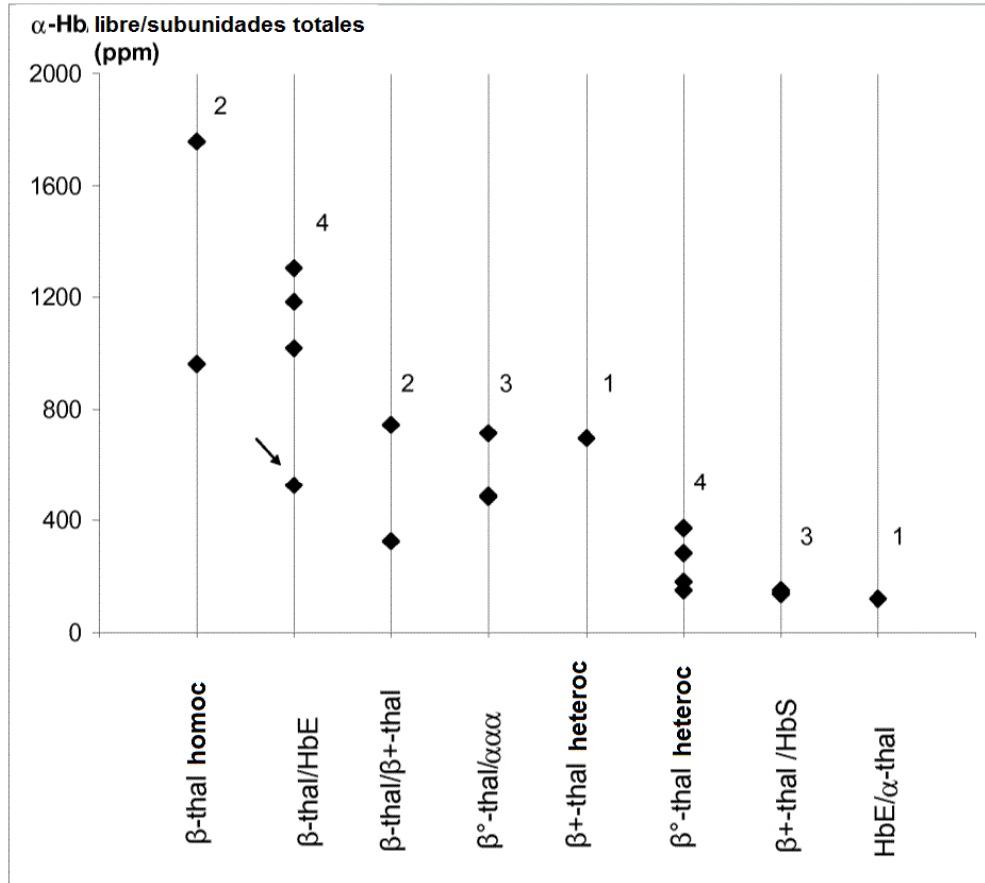


Figura 3

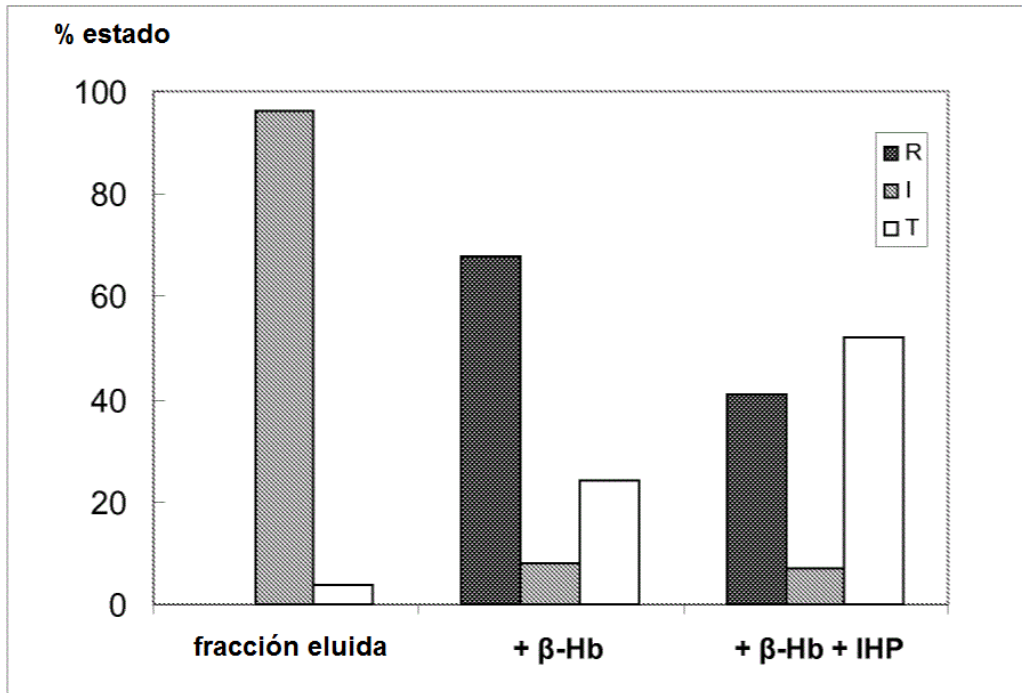


Figura 4

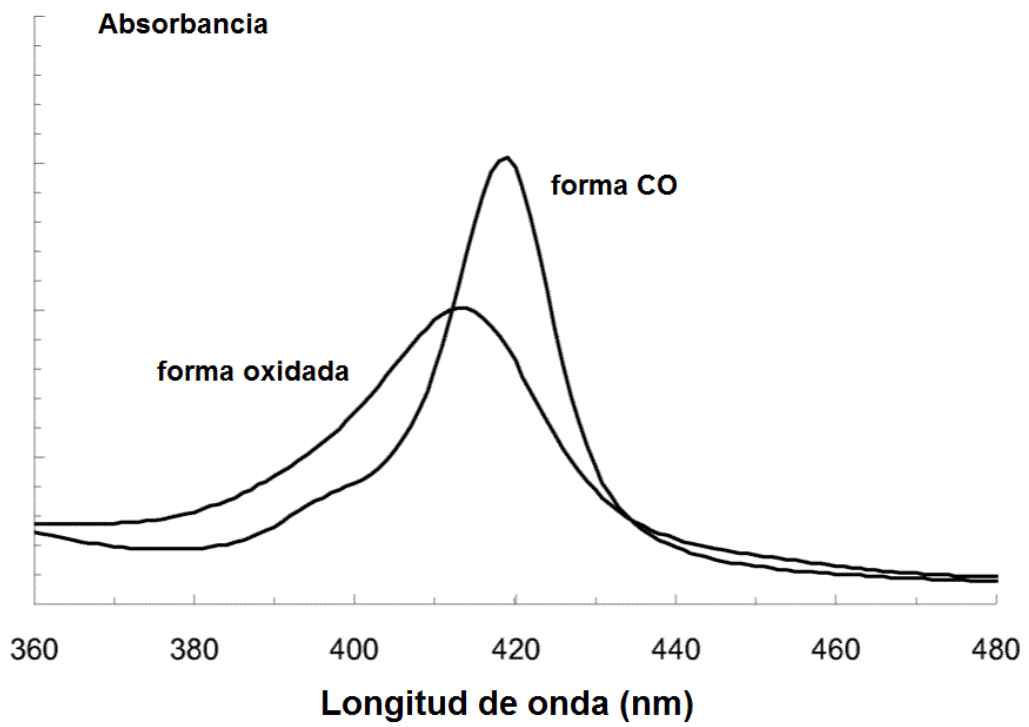


Figura 5