

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 775**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2010** **PCT/EP2010/003783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010** **WO10145849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2010** **E 10730357 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2437736**

54 Título: **Sistemas de suministro de fármacos**

30 Prioridad:

05.06.2009 GB 0909754

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

07.12.2017

73 Titular/es:

ERYDEL S.P.A. (100.0%)
Via Sasso 36
61029 Urbino (PU), IT

72 Inventor/es:

MAGNANI, MAURO;
ROSSI, LUIGIA;
BIAGIOTTI, SARA y
BIANCHI, MARZIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 645 775 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

Sistemas de suministro de fármacos

- 5 La presente invención se refiere al uso de glóbulos rojos como vehículos de suministro de fármacos y a métodos para producir los mismos.

Introducción

- 10 Los eritrocitos, también conocidos como glóbulos rojos (GR), se usan normalmente para transfusiones para reemplazar sangre perdida. Además de este uso bien conocido, los GR ahora se están usando en numerosas nuevas aplicaciones, lo mismo como terapéuticas que como agentes de diagnóstico. La mayoría de estas aplicaciones son posibles debido a la peculiar propiedad de estas células que les permite abrirse y liberarse sin afectar sus propiedades principales o en circulación *in vivo*. La tecnología para lograr esto se describe en los documentos US-A-6,139,836 y EP-A-882448 y permite que el procedimiento se realice en la clínica, con cantidades mínimas de sangre del paciente, para producir GR procesados.

- 20 El uso biomédico de estos GR procesados son numerosos e incluyen la posibilidad de obtenerse por ingeniería los mismos mediante la adición de fármacos, biología y/o nanomateriales. Estas construcciones proporcionan una adición significativa al arsenal disponible para los médicos para la liberación de fármacos en circulación, para el direccionamiento de fármacos a sitios seleccionados en el organismo, o para procedimientos diagnósticos *in vivo* basados en métodos magnéticos y/u ópticos.

- 25 Se han usado GR humanos autólogos con análogos de corticoesteroides en el tratamiento de fibrosis quística, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y pacientes de EPOC. Basándose en estos hallazgos, la E.M.E.A ha concedido la denominación de "fármaco huérfano" al "fosfato sódico de dexametasona para la encapsulación en eritrocitos humanos para el tratamiento de la fibrosis quística" (denominación de fármaco huérfano EMEA/OD/039/04-EU/3/04/230).

- 30 La encapsulación de nanopartículas superparamagnéticas dentro de GR ha llevado a la generación de nuevas construcciones biomiméticas que ahora permiten el uso de estos nanomateriales *in vivo*, evitando su rápido secuestro y su acumulación en áreas no deseadas (documento WO 2008/003524).

- 35 De manera similar, la encapsulación de agentes fluorescentes infrarrojos en GR ha abierto el camino a la medición de la vasomoción en la vasculatura retinal humana, lo que sugiere una posible correlación con el edema retinal [Reunión Macula 2009 en Nueva York].

- 40 Mutz y col. (documento US2009/053245) desvela un método para modular al menos una propiedad farmacocinética de una enfermedad antiangiogénica o sanguínea o terapéutico de esteroides y efizacia cuando se administra a un huésped.

- 45 Liu y col. (1991, Cell, Vol.66, 807-815) desvela que los complejos ciclofilina-CsA y FKBP-FK506 (pero no ciclofilina, FKBP, rapamicina-FKBP o FKBP-506BD) se unen de manera competitiva a e inhiben el Ca^{2+} - y la calcineurina fosfatasa dependiente de calmodulina.

- Una limitación en el uso de GR como portadores para fármacos es la permeabilidad de la membrana de los GR. Una vez el fármaco seleccionado se ha encapsulado usando el procedimiento tal como se describe anteriormente, existen tres posibilidades:

- 50 • El fármaco se retiene indefinidamente del GR ya que no está siendo transportado por, o no se difunde fuera de, la membrana y permanece en circulación siempre y cuando el GR cargado permanezca intacto;
 • El fármaco se libera inmediatamente por el GR cargado porque puede difundirse fácilmente a través de la membrana del GR; o
 55 • El fármaco no es difusible, permaneciendo dentro del GR hasta que se convierte a una forma difusible, tal como dexametasona-21-fosfato, que permanece hasta que el grupo fosfato se hidroliza para formar dexametasona.

- Por tanto, el suministro de fármacos usando eritrocitos es una plataforma tecnológica que se presta a una amplia gama de aplicaciones, pero que está sometida a una incapacidad inherente de controlar la liberación de sustancias transportadas por los GR procesados.

- 60 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que es posible usar GR como vehículos de suministro de fármacos para fármacos difusibles, mediante la incorporación de proteínas dentro de los GR que tienen una afinidad por el fármaco y que no se difunden fácilmente fuera del GR. En otras palabras, hemos encontrado que los Glóbulos Rojos pueden usarse como sistemas de suministro de fármacos cuando contienen proteínas que no se difunden fácilmente fuera y que forman complejos de afinidad con el fármaco deseado. También se prevé que los Glóbulos Rojos cargados con proteínas capaces de formar complejos de afinidad con fármacos seleccionados también podrían

administrarse a un humano como antídoto en un caso de intoxicación causado por el consumo accidental de una cantidad de fármaco superior del previsto.

Sumario de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un glóbulo rojo modificado, en el que la modificación comprende un complejo de asociación que comprende un fármaco y una proteína transportadora recombinante para el fármaco, en el que la forma no complejada del fármaco es capaz de atravesar la membrana del glóbulo rojo y en el que la proteína transportadora recombinante no complejada en una inmunofilina.

Se desvela un glóbulo rojo que contiene una proteína que no pasa fácilmente la membrana del glóbulo rojo y que puede formar un complejo de asociación con un fármaco diana, siendo la forma no complejada del fármaco capaz de atravesar fácilmente la membrana del glóbulo rojo.

Preferentemente, la proteína o un análogo de la misma, se produce en glóbulos rojos de tipo salvaje y se encuentra presente a niveles elevados. GR de tipo salvaje son los que se encuentran de modo natural en un paciente o una población, antes de cualquier modificación. Los GR adecuados pueden ser los propios del paciente, cuando se conoce el paciente o pueden ser de cualquier fuente adecuada. Una fuente preferida es un donante universal (grupo sanguíneo O, Rhesus negativo).

Los GR son preferiblemente no modificados, distintos a los que introducen la proteína. Cuando son modificados, pueden modificarse de forma adecuada para evitar el escape de la proteína, por ejemplo, o para permitir el escape del fármaco. El primero puede ser mediante el bloqueo de las rutas de escape, tales como proteínas de transporte o mediante el bloqueo de enzimas capaces de catabolizar la proteína, mientras que el segundo puede ser mediante la permeabilización de la membrana o transformación de los GR para expresar o incorporar un transportador de membrana del fármaco.

El GR puede diseñarse por ingeniería para expresar la proteína. En caso que la proteína ya está expresada en el GR, tal diseño por ingeniería podría ser mediante la amplificación del número de genes o mediante el aumento de las tasas de transcripción de ARNm, tal como usando un promotor de número de copia mayor.

Los GR maduros no continúan expresando proteínas y puede que no sea deseable expresar grandes cantidades de proteína transportadora antes del uso previsto. La transformación también requiere un sistema reproductivo y generalmente un huésped, por lo que no será normalmente adecuado para el tratamiento general. En consecuencia, se prefiere abrir el GR, tal como se describe en el documento US-A-6,139,836 por ejemplo, introducir la proteína transportadora y a continuación liberar el GR. El GR resultante y procesado puede exponerse a continuación al fármaco. Según el fármaco puede atravesar la membrana del GR, puede, a continuación, formar un complejo de asociación con la proteína transportadora y los GR pueden a continuación usarse para cualquier terapia prevista.

Se entenderá que, en esta realización, el GR ya puede expresar la proteína transportadora, pero esa proteína transportadora adicional puede incorporarse, para aumentar la capacidad transportadora del GR para el fármaco. Se ha encontrado que tal aumento es generalmente directamente proporcional a la cantidad de proteína extra añadida. A este sentido, los GR son sorprendentemente elásticos a los cambios en el contenido de la proteína, de modo que tales cantidades de proteína transportadora pueden elevarse hasta el 5 % p/p o hasta aproximadamente 10 veces los niveles que aparecen naturalmente si este no excede el 5 % p/p.

Preferentemente, el GR puede consistir únicamente de la proteína, es decir, con todas las proteínas de la membrana retiradas, aunque se prefiere la presencia de hemoglobina.

La proteína (es decir, inmunofilina) puede ser un análogo, un mutante o una variante de una proteína que aparece naturalmente. Puede diseñarse por ingeniería para la facilidad de expresión o recogida, para mejorar o reducir la afinidad de fármaco o para expresar solo aquellas unidades responsables de la unión de fármaco o para expresar múltiples unidades de unión de fármaco como una proteína, por ejemplo. También se prefieren las proteínas químicas.

Por 'complejo de asociación' quiere decirse que el fármaco y las proteínas se atraerán juntas *in situ*. Esta atracción debe ser suficiente para permitir que los GR actúen como un depósito de fármaco, pero no tan fuerte que retire efectivamente el fármaco fuera de la solución por completo. El constante de disociación debe ser tal que sea posible conseguir niveles terapéuticos de fármaco con transfusiones entre 50 ml y 500 ml de sangre procesada, preferiblemente dentro de 5 minutos y 2 horas de transfusión. Los valores K_d adecuados pueden encontrarse en el intervalo de 10^4 a 10^9 M⁻¹.

La proteína no es capaz de atravesar fácilmente la membrana del GR. A consecuencia del tamaño, es posible generalmente evitar el pase de proteína a través de la membrana prácticamente de forma completa. Si no es posible, por lo tanto, no más del 50 % de la proteína debe ser capaz de escapar dentro de las 24 horas, pero se prefiere reducir esto a no más del 5 % y preferiblemente no más del 1 %. La cantidad de proteína atrapada que se

libera podría medirse de distintas maneras conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de método inmunoquímico (es decir, ensayos ELISA), ensayos radioinmunoquímicos o mediante la detección de proteína mediante la medición de su actividad biológica (en caso de que la proteína atrapada sea una enzima, por ejemplo).

- 5 El fármaco debe ser capaz de atravesar la membrana y se prefiere que este pase libre, o facilitado, tal como mediante canales adecuados o transportadores, o mediante poración del GR. No se prefiere el último, ya que puede tener un efecto perjudicial sobre el GR.

No existe un límite particular en la naturaleza del fármaco, siempre y cuando pueda atravesar la membrana del GR.

- 10 Para facilitar la producción, se prefiere que el fármaco sea capaz de atravesar la membrana de un GR no modificado. El fármaco puede ser un fármaco bien conocido o una forma modificada que sea capaz de atravesar una membrana de un GR. El último se prefiere generalmente menos, ya que puede tener un efecto sobre la actividad del fármaco. Este concepto se ilustra en el presente documento mediante un número de ejemplos no limitativos.

- 15 La proteína, una inmunofilina y el fármaco son capaces de asociarse. El fármaco asociado es un fármaco capaz de unir dicha proteína (una inmunofilina) hasta el punto que la encapsulación dentro de los GR es posible, como se describe en el presente documento. Además, muchos fármacos son conocidos por tener compañeros de unión que se asocian con ellos, tales como FKBP12 y FK506, o Ciclosporina y Ciclofilina. Se prefieren tales combinaciones. Sin embargo, también hemos mostrado que la rapamicina puede asociarse con FKBP12 y ser útil en la presente invención. La presente invención, por lo tanto, abarca todos los fármacos y sus compañeros de unión de proteína asociados en los que la forma no complejada del fármaco es capaz de atravesar fácilmente la membrana del glóbulo rolo y en el que la proteína no complejada no puede atravesar fácilmente la membrana del glóbulo rojo, en el que el compañero de unión de la proteína es una inmunofilina.

- 25 Los fármacos también pueden ser agentes inmunosupresores y/o antivirales. Por ejemplo, la ciclosporina y sus derivados se usan para tratar el VHC. El fármaco también puede ser un agente anticancerígeno. Por ejemplo, la rapamicina se usa para tratar células tumorales. El inmunosupresor es preferiblemente capaz de inhibir la activación de la calcineurina fosfatasa mediante la formación de un complejo con calcineurina y la inmunofilina. Por tanto, la inmunofilina se selecciona preferiblemente de FKBP12 (o sus análogos, o Ciclofilina (o sus análogos) o el
30 inmunisupresor es un inhibidor de calcineurina. El inhibidor de calcineurina se selecciona preferiblemente de FK506 o Ciclosporina.

Por tanto, el fármaco es preferiblemente rapamicina o sus análogos y lo más preferiblemente FK506 o sus análogos. En estos casos, se prefiere que la proteína asociada sea FKB12 o sus análogos. El fármaco también puede ser, preferentemente, Ciclosporina o sus análogos y en este caso se prefiere que la proteína asociada sea Ciclofilina o sus análogos.

- 40 Se desvela adicionalmente un GR tal como se ha descrito anteriormente, pero que contiene poco o nada de fármaco. El fármaco puede añadirse en, o cerca del, tiempo de administración. Esto puede ser de ayuda si una exposición prolongada al fármaco es perjudicial en cualquier modo para el GR, o cuando el fármaco tiene un período de vida limitado una vez se ha expuesto a los GR, por ejemplo.

También se desvelan métodos para el tratamiento o profilaxis de cáncer o virus o métodos de inmunosupresión que comprende la administración de los presente GR a pacientes que lo necesitan.

- 45 También se desvelan un método de reducción de la concentración de un fármaco seleccionado en el fluido corporal de un paciente, preferiblemente el plasma, que comprende la administración de Glóbulos Rojos cargados con proteínas asociadas capaces de formar complejos de afinidad con el fármaco seleccionado. El fármaco seleccionado puede absorberse formando un complejo con el fármaco, reduciendo, de este modo, la actividad del fármaco o biodisponibilidad y, por lo tanto, su toxicidad. La toxicidad puede estar causada por el consumo accidental de una cantidad de fármaco superior a la esperada, por lo tanto, se prefiere un método de tratamiento de sobredosis. Preferentemente, se administran pequeñas cantidades del GR cargado con proteína y la dosis se aumenta gradualmente mientras que se controlan los niveles del fármaco, por ejemplo, evaluando el fluido corporal regularmente.

- 55 La invención se describirá ahora en más detalle con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- 60 **Figura 1 - construcción pET-45b(+)-FKBP12.** Se insertó la codificación de ADNc para la longitud completa de FKBP12 en el vector pET-45b(+) aguas abajo de la secuencia de codificación de marcador de poli(histidina). La transcripción del inserto de ADN clonado con el promotor T7 originará una forma recombinante de FKBP12 humano con marcador de histidina en el dominio N-terminal.

- 65 **Figura 2 - homogenatos de SDS-page de BL21(DE3).** Carril 1: BL21(DE3) no incluido, Carril 2: BL21(DE3) inducido con IPTG. Los extractos totales de proteína (30 µg) obtenidos a partir de células de BL21(DE3)

homogeneizado se separaron en un 15 % de gel SDS-poliacrilamida.

Figura 3 - Caracterización de FKBP12 purificada a) SDS-PAGE b) inmunotransferencia. Carril 1: Estándares de bajo peso molecular, carril 2: FKBP12. 1,0, 2,5 y 5.0 µg de FKBP12 purificado se sometieron a desarrollo por electroforesis en un 15 % de SDS-page seguido de tinción con azul Coomassie y prueba densiométrica para verificar el peso molecular y nivel de pureza de las proteínas.

Figura 4 - Análisis por transferencia puntual de unión de rFKBP12-FK506. Desde la parte superior hasta la parte inferior: FKBP12 10, 5 e 2,5 µg/pocillo. Se cargaron distintas cantidades de FKBP12 sobre un 15 % de gel de poliácridamida, transferido sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro y sometido a análisis por transferencia puntual tal como se describe en la sección de Materiales y métodos.

Figura 5 - Recuperación celular. El porcentaje de recuperación celular obtenido al final del procedimiento de carga se calculó para el GR cargado con FKBP12 (20, 40 y 80 µM) y el GR no cargado respectivamente para las células no tratadas añadidas al inicio del procedimiento.

Figura 6 - Estabilidad de las células cargadas. Las células sometidas al procedimiento de carga (GR cargado y no cargado) se incubaron hasta 6 días antes del tratamiento y se estimaron las curvas de supervivencia para cada muestra.

Figura 7 - Capacidad de unión de GR cargado con FKBP12 para Tacrolimus. El gráfico muestra la capacidad de unión para el Tacrolimus calculado para el GR cargado con FKBP12 a una concentración de 20, 40 y 80 µM en comparación con la calculada para eritrocitos nativos.

Figura 8 - Concentración de FKBP12 recombinante en GR diseñado por ingeniería. Se evaluó concentraciones de rFKBP12 que lograron en los eritrocitos humanos llevando a cabo procedimientos de carga con una especie de FKBP12 radiomarcada realizada en las mismas condiciones de cargas anteriormente informadas (20, 40 y 80 µM de proteína frente a ml de GR).

Figura 9 - Cromatograma CsA y CsD de UPLC. Desarrollo cromatográfico de muestra estándar compuesta de CsA (10 µg/ml) y CsD (10 µg/ml).

Figura 10 - homogenatos de SDS-PAGE de BL21(DE3) y SDS-PAGE (a) e inmunotransferencia (b) de CypA purificada. Carriles de 1 a 6: Estándares de bajo peso molecular (BPM), BL21(DE3) no incluido, BL21(DE3) inducido con IPTG durante 1,2, 3 y 4 horas. Los extractos totales de proteína (30 µg) obtenidos a partir de células de BL21(DE3) homogeneizado se separaron en un 15 % de gel SDS-poliacrilamida.

a) Carril 1: estándar de BPM, carril 2-4: CypA. 1,0, 2,5 y 5,0 µg de CypA purificada se sometieron a desarrollo por electroforesis sobre un 15 % de gel de poliácridamida seguido de tinción con azul Coomassie y prueba densiométrica para verificar el peso moléculas y nivel de pureza de las proteínas. b) Las bandas de proteína se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm y se inmunotransfirieron para verificar la identidad de la proteína.

Figura 11 - concentración intra-eritrocítica de ¹²⁵I-CypA y capacidad de unión de CsA del GR cargado con CypA. Panel superior: Se cargó ¹²⁵I-CypA en GR humano y la radioactividad recuperada usada para estimar la cantidad de proteína atrapada en distintas condiciones de carga distintas. Panel inferior: En el histograma se representan las capacidades de unión para la CsA observada para GR cargado a una concentración de 20, 40 y 80 µM en comparación con la encontrada para eritrocitos no cargados.

Descripción detallada de la invención

La evaluación de la estabilidad *in vitro* de GR cargado con FKBP12 mostró que no existían diferencias entre las curvas de supervivencia de eritrocitos cargados en comparación con las células no cargadas, sugiriendo que el excedente de proteína no disminuye la vitalidad celular. También hemos demostrado que los eritrocitos cargados tienen una capacidad de unión notablemente superior para el fármaco en comparación con el GR nativo.

Además, nuestros datos demuestran que la cantidad de fármaco asociado con los glóbulos rojos depende estrechamente de la concentración de proteína añadida a las suspensiones de GR en la etapa de diálisis. Preferentemente, la unión fármaco-proteína es estequiométrica en una proporción de aproximadamente 1: 1, y que cree que se refleja dentro de los glóbulos rojos. Por tanto, se ha demostrado que:

- 1) es posible encapsular una proteína tal como FKBP12 dentro de eritrocitos humanos;
- 2) la encapsulación es dependiente de dosis; y
- 3) un atrapamiento de proteína superior se corresponde con una concentración de fármaco intraeritrocítico superior. De hecho, los glóbulos rojos cargados con cantidades de proteína en aumento (20, 40 y 80 µM) fueron capaces de unir una cantidad de fármaco 4, 6 y 11 veces superior que las células nativas.

Una ventaja adicional es que los GR procesados de la presente invención evitan el metabolismo hepático prematuro y, mediante el uso de eritrocitos autólogos como vehículo, se evitan reacciones anafilácticas.

Después del procesamiento para incorporar la proteína transportadora y el fármaco, los GR pueden suspenderse en un vehículo adecuado. Este puede ser salino, pero es preferiblemente plasma y, puede ser adecuadamente plasma de un paciente, y puede ser plasma colocado a un lado cuando se aíslan los GR del paciente. Si el vehículo no es plasma, se entenderá, por lo tanto, que debe tenerse cuidado en evitar un choque osmótico mediante el uso de una solución salina fisiológica.

La preparación de GR puede contener opcionalmente otros ingredientes, tal como una fuente de energía, y conservantes, y puede almacenarse de cualquier modo adecuado para almacenar sangre.

La cantidad de preparación usada puede ser normalmente entre 50 ml y 500 ml y puede administrarse tan a menudo como lo recomienda un médico. Esto puede ser una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes o cualquier otro intervalo, según sea apropiado.

Una realización particularmente preferida de la presente invención proporciona un GR con niveles mejorados de FKBP12 (la proteína de unión 12-kDa FK506 véase a continuación). Se proporciona adicionalmente tal un GR en el que todo, o una parte sustancial del FKBP12 se encuentra en la forma de un complejo de asociación con FK506. Esta realización se describe adicionalmente a continuación.

El Tacrolimus (también conocido como FK506, Prograf) es un antibiótico macrólido producido y aislado del actinomiceto *Streptomyces Tsukubaensis*, y tiene una actividad inmunosupresora muy alta. Se aprobó por primera vez en 1994 para la prevención de rechazos en trasplantes de hígado, el FK506 ahora está indicado en varios países como una terapia inmunosupresora primaria en el trasplante de hígado, riñón, páncreas, corazón y pulmón o como terapia de rescate en rechazos de aloinjerto que son resistentes a otros agentes inmunosupresores o allí donde tales agentes producen efectos secundarios intolerables [Tsunoda SM 2000, Ciancio G 1999, Plosker GL 2000].

Tacrolimus 3S-[3R*(E(1S*,3S*,4S*)),4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,-16R*,18S*,19S*,26aR*)]-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahidro-5,19-dihidroxi-3-[2-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexilo)-1-metiletenilo]-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-8-(2-propenil)-15,19-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazaciclotricosina-1,7,20,21(4H,23H)-tetrona de monohidrato, CAS número 104987-11-3), como Ciclosporina, pertenece a la clase de "inhibidores de calcineurina", puesto que su actividad inmunosupresora depende de su capacidad de unir e inhibir la enzima calcineurina, una fosfatasa serina/treonina dependiente de calcio. En el nivel molecular, la unión del fármaco con la fosfatasa está mediada por una proteína citosólica que pertenece a la familia de las inmunofilinas, la proteína de unión 12-kDa FK506 (FKBP12). *In situ*, la FK506 une FKBP12, y el dúplex FK506-FKBP12 resultante forma un complejo ternario con calcineurina, inhibiendo de este modo su actividad. La inhibición de enzima resulta en el bloqueo de la defosforilación de NF-AT (Factor nuclear de células T activadas), impidiendo de este modo su translocación dentro del núcleo y la transcripción del gen IL-2 [Griffith JP 1995].

Macroscópicamente, el bloqueo de IL-2 y otras rutas, por el Tacrolimus resulta en una falta de activación y proliferación de células T, y en la inhibición de la respuesta inmune mediada por células.

A pesar de su eficacia terapéutica, demostrado por una potencia *in vitro* 100 veces superior que la Ciclosporina y una reducción *in vivo* de la incidencia de rechazo de tejido [Armenti VT 1998], la FK506 posee una ventana terapéutica muy estrecha (5-20 ng/ml sangre completa 10-12 horas post dosis) y exhibe frecuentemente episodios de toxicidad, que incluye nefrotoxicidad, neurotoxicidad, intolerancia a la glucosa, etc. [Tsunoda SM 2000; Kershner RP, 1996]. Además, la FK506 presenta una alta variabilidad en el perfil farmacocinético entre paciente y un amplio metabolismo presistémico y sistémico que muestra una biodisponibilidad oral que varía del 4 al 93 % y una semivida en circulación entre 3,5 y 40 horas [Undre NA 2003, Iwasaki K 2007]. La pobre correlación de dosis con respecto a la concentración en sangre y el bajo índice terapéutico, hace del control de las concentraciones de sangre completa de Tacrolimus algo necesario en pacientes sometidos al tratamiento con el fármaco (Control de fármaco terapéutico) [Shaw LM 1999]. Adicionalmente, aunque la inyección endovenosa evita la adsorción y tejidos de biodisponibilidad, esta forma de administración parenteral está a menudo comprometida por reacciones anafilácticas inducidas por el vehículo (aceite de ricino hidrogenado con PEG-60) utilizado como emulsionante para estabilizar el Tacrolimus en soluciones acuosas.

La FK506 en sangre está principalmente asociada con eritrocitos (aproximadamente 85 %) seguido por plasma (14 %) y linfocitos (0,46 %) [Chow FS 1997]. Esta alta fracción de GR se debe a la presencia en eritrocitos de al menos dos tipos de inmunofilinas que unen el fármaco con una muy alta afinidad: FKBP12 (citada anteriormente), una proteína citosólica 12-kDa con actividad de peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa, y FKBP-13, una membrana 13-kDa asociada con proteína con al menos un 43 % de identidad de aminoácido con FKBP12 [Walensky LD 1998]. La capacidad de unión de GR se calcula aproximadamente 440 ng/ml de sangre [Chow FS 1997].

La FKBP12 y sus análogos son proteínas útiles para la formación de complejos de asociación y también pueden

usarse para formar complejos de otros fármacos inmunosupresores, tal como rapamicina, por ejemplo.

- Las ciclofilinas y sus análogos son ejemplos adicionales de proteínas que también pueden usarse para formar complejos de inmunosupresores, especialmente ciclosporina. La Ciclosporina A (CsA) es un polipéptido cíclico lipófilo, producido por el hongo *Tolypocladium inflatum*, que pertenece a la clase de inmunosupresores de "inhibidores de calcineurina". La CsA, como el Tacrolimus, inhibe la activación de la calcineurina fosfatasa activada por calcio/calmodulina a través de la formación de complejo con ciclofilina y, por lo tanto, evita la translocación del factor de transcripción de "factor nuclear de células T activadas" (NF-AT) [Dunn CJ 2001]. Puesto que se introdujo por primera vez en los 80, la Ciclosporina A ha mejorado el resultado de trasplante de órganos sólidos.
- Desafortunadamente, la CsA se caracteriza por una variabilidad farmacocinética intra e inter paciente y una pobre biodisponibilidad. La biodisponibilidad de la CsA puede verse afectada por varios factores entre los que se incluye el tiempo después de la cirugía, terapia concomitante, cambio en la función gastrointestinal y preparación farmacéutica [Faulds D 1993, Pollard S 2003] así como por polimorfismos genéticos en el gen MDR1 o genes CYP3A4/CYP3A5 [Cattaneo D 2004]. Además, el perfil de tolerabilidad de la ciclosporina se caracteriza por una cantidad de efectos adversos potencialmente graves que están relacionados con la exposición, que incluye la nefrotoxicidad aguda o crónica, hipertensión y neurotoxicidad. El efecto adverso limitante de dosis de la ciclosporina es la nefrotoxicidad, que normalmente se presenta como una disminución reversible en la tasa de filtración glomerular [Naesens M 2009].
- Una concentración de sangre completa de 50-1000 ng/ml, más del 70 % de CsA está asociado a eritrocitos; la CsA citosólica está unida a la Ciclofilina A de eritrocito de peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa [Foxwell BM 1988]. La capacidad de unión de GR total para la CsA que asciende a 43×10^{-5} nmol por 10^6 de GR [Foxwell BM 1988, Reichel C 1994]. El siguiente ejemplo se refiere a la posibilidad de aumentar la cantidad de CsA asociada con el GR mediante el aumento de la concentración citosólica de la Ciclofilina A (CypA) inmunofilina.
- Se prefiere particularmente que la FKBP12 (o sus análogos) vaya acompañada de FK506, o la Ciclofilina vaya acompañada de la CsA. Sin embargo, la FKBP12 (o sus análogos) pueden también ir acompañados de rapamicina. Por lo tanto, la FKBP12 puede unir (y transportar una vez atrapada dentro de los glóbulos rojos) tanto tacrolimus (FK506) como rapamicina.
- Por análogos se refiere a cualquier variante funcional que tenga las mismas propiedades o similares que la permitan funcional del mismo modo que la molécula nombrada (esté presente en el fármaco o presente en la proteína) en la presente invención. Los mismo se aplica a los derivados. Por ejemplo, los análogos de FKBP12 (también conocidos como FKBP1A) incluyen FKBP25, FKBP51 y FKBP52; y los análogos de la Ciclofilina incluyen Ciclofilina A. Los análogos de la rapamicina se conocen en la técnica como "rapálogos" e incluyen análogos de rapamicina fluorada (Chembiochem. 22 Mar 2010; 11(5):698-702). Entre los análogos de Ciclosporina se incluye Ciclosporina A, auerobasidina A, PKF-211-811-NX5 (NIM811) y sangliferina A (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Mar;30(3):419-25) y otros análogos desvelados en Biochemical and Biophysical Research Communications, Volumen 363, publicación 4, 30 de noviembre de 2007, Páginas 1013-1019.
- Por ejemplo, la rapamicina ha demostrado asociarse con la inmunofilina FKBP12 y FKBP 25, ambas uniendo rapamicina con alta afinidad (Biochemistry. 3 Mar 1992;31(8):2427-34. Una inmunofilina de 25-kDa selectiva de rapamicina. Galat A, Lane WS, Standaert RF, Schreiber SL.)
- La proteína, por ejemplo FKBP12, puede encapsularse dentro de eritrocitos (preferiblemente humanos) por medio de un procedimiento de diálisis hipotónica, liberación isotónica y "reatemperación". Se prefiere particularmente que este método, tal y como se ha descrito anteriormente en el documento EP 0 882 448 A1 o tal como se describe en mayor detalle en los presentes ejemplos. En resumen, se prefiere que los glóbulos rojos humanos se obtuvieran a partir de sangre recién recogida y lavada para retirar leucocitos y plaquetas. A continuación, los GR recuperados se volvieron a suspender, por ejemplo al 70 % de hematocritos, en solución fisiológica. La suspensión puede a continuación alicuotarse y la proteína añadirse a concentraciones que aumentan. Cada suspensión de eritrocito puede, a continuación, someterse a diálisis en tubos de diálisis y suspensiones de GR recogidas y dejadas que se estabilicen. La liberación de eritrocitos puede obtenerse mediante incubación de células con volúmenes relativamente pequeños (por ejemplo solo 0,1 de volúmenes) de solución hipertónica en condiciones de liberación conocidas (por ejemplo a 3000 mOsm que contiene inosina 100 mM, ATP 20 mM, glucosa 10 mM, piruvato de sodio 100 mM, MgCl2 4 mM, NaCl 190 mM, KCl 1666 mM y NaH2PO4 33 mM (pH 7,4)).
- Los GR liberados pueden, a continuación, incubarse a temperatura corporal en presencia de la solución hipertónica para permitir la re-atemperación de los segmentos de la membrana y aumentar la recuperación celular final. Finalmente, los eritrocitos cargados se lavaron al menos una vez en tampón fisiológico para retirar la fracción de FKBP12 no cargada del medio externo. El MCV de índices corpusculares de GR, Volumen corpuscular medio, MCH, Hemoglobina corpuscular media y MCHC, Concentración de hemoglobina corpuscular media) puede, a continuación evaluarse para tanto las células cargadas como no cargadas al final del procedimiento. Se proporcionan detalles adicionales en los ejemplos.
- La presente invención aumenta la cantidad de fármaco transportado por eritrocitos para usarlos como sistema de suministro lento para fármacos, especialmente inmunosupresores, particularmente Tacrolimus, rapamicina y/o

ciclosporina, y análogos o derivados, y distribuir bajas dosis de los mismos en circulación. La administración a través de eritrocitos autólogos segura un vehículo seguro y no inmunogénico para el fármaco, lo protege de un metabolismo hepático prematuro y reduce los efectos secundarios proporcionando dosis bajas y constantes de fármaco, sin producir picos en los niveles de plasma.

Las proteínas recombinantes se incluyen dentro del alcance del término "proteína" en el presente documento. En particular, se prefiere FKBP12 (rFKBP12) recombinante como la proteína.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Materiales y métodos

Obtención de una forma recombinante de FKBP12 humana: se extrajo el ARNm total de células U937 y se amplificó mediante reacción de cadena de la polimerasa (PCR) usando un oligo-dT como cebador no específico, a continuación se obtuvo ADNc mediante retro-transcripción. A continuación, el segmento de ADNc que codifica el gen FKBP12 (número de referencia del banco de genes NM_000801) se amplificó mediante PCR con 5'-TCCGCCACGTGATGGGAGTGCAGGTGGAAAC-3' (SEQ ID NO: 1) como cebador directo y 5'-GAGGCCAGGATCCTCATTCCAGTTTGAAGC-3' (SEQ ID NO: 2) como cebador inverso. El producto de PCR resultante se verificó mediante secuenciación en ambas direcciones con un secuenciador capilar (PE 310 Perkin Elmer). ADNc-FKBP12 se purificó finalmente a través del kit de purificación PCR MiniElute (Qiagen), digerido con BamHI y PmlI y ligado en un vector pET-45b(+) (Novagen) digerido de forma similar. El gen de FKBP12 se insertó en el vector de expresión aguas abajo de la secuencia de codificación del marcador de poli(histidina) (Figura 1) de modo que la transcripción y traducción del plásmido producirá una FKBP12 marcada con 6His N-terminal FKBP12, SEQ ID NO: 3):

```
ATGGCACATCACCACCACCATCACGTGATGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGACGGGCGC
ACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACCTACACGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAATTT
GATTCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGG
GAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTAT
GGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAA
CTGGAATGA
```

células competentes (Stratagene) de *E. coli* BL21(DE3) se transformaron mediante la construcción obtenida de pET45b-FKBP12. Las células a continuación se cultivaron en un medio Luria-Bertani (LB) (10 g/l de Bacto-Tryptona, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 10 g/l de NaCl) a un pH de 7,0 que contenía ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C con agitación hasta que la densidad óptica de cultivo a 600 nm alcanzó 0,6-0,7. La sobreexpresión de la FKBP12 recombinante se indujo, a continuación, mediante adición al cultivo ambos 1 mM de *isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido* (IPTG) y se dejó crecer durante otras 2 horas a 37 °C con agitación. Los BL21(DE3) inducidos se granularon y lisaron mediante homogeneización realizado en tampón de lisis (tampón de fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, β-mercaptoetanol 3 mM y PMSF (fenilmetanesulfonilfluorido) 0,1 mM) con Emulsificante-C5 (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada). Se purificó 6His-FKBP12 hasta la homogeneidad a través de una cromatografía de afinidad a Ni de única etapa realizada sobre un Purificador AKTA (Amersham Pharmacia Biotech). Después de centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos, el homogenato se cargó sobre una columna empaquetada de alto rendimiento de Sefarosa Ni pre-equilibrada con tampón de fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM y MSH 3 mM. La columna se lavó exhaustivamente para retirar las proteínas no unidas y se llevó a cabo la elución de proteínas unidas mediante un gradiente de imidazol de 10 a 250 mM en el mismo tampón. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-page y aquellas más puras que contenían 6His-FKBP12 se reunieron y dializaron frente a 2 litros de tampón de almacenamiento (Hepes 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, azida de sodio 1 mM). Se verificó la pureza final de la FKBP12 recombinante mediante electroforesis sobre 15 % de gel de acrilamida y tinción con azul Coomassie y la identidad de la proteína purificada se certificó mediante inmunotransferencia usando un ratón policlonal anti-FKBP12 (Abnova, Taipei city, Taiwan).

Estudios de unión preliminares de rFKBP12-FK506: se evaluó la capacidad de 6His-FKBP12 en unir el ligando FK506 mediante un análisis de transferencia puntual ligeramente modificado. En resumen, el 6His-FKBP12 en condiciones nativas se transfirió puntualmente sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm en concentraciones en aumento (2,5, 5, 10 µg/pocillo). A continuación, la membrana se sometió a una única etapa de incubación con una solución de conjugado de peroxidasa de rábano picante de Tacrolimus (PRO-Trac™ II Tacrolimus 5x Conjugado, DiaSorin, Stillwater, MN, USA) para permitir la unión de FKBP12-Tacrolimus. Después de lavar con suero salino tamponado con tris (TBS) con un 0,05 % de Tween20, se reveló la señal por el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Carga de FKBP12 recombinante en eritrocitos humanos: se encapsuló FKBP12 recombinante en eritrocitos humanos por medio de un procedimiento de diálisis hipotónica, liberación isotónica y "reatemperación" tal como se ha descrito previamente [Magnani M 1989]. En particular, se obtuvieron glóbulos rojos humanos a partir de sangre

recién recogida en heparina a partir de donantes sanos y se lavó con solución fisiológica que contenía Hepes 10 mM (pH 7,4), NaCl 154 mM y Glucosa 5 mM para retirar leucocitos y plaquetas. Los GR recuperados se suspendieron al 70 % de hematocritos en solución fisiológica, la solución se alicuotó en 3 tubos y se añadió rFKBP12 en concentraciones en aumento (20, 40, 80 μ M/tubo). Cada suspensión de eritrocitos se sometió a diálisis en un tubo de diálisis con un corte de 3,5 kDa durante 90 minutos a 4 °C frente a 50 volúmenes de solución hipotónica de 60 mOsm que contenía NaH₂PO₄ 10 mM, NaHCO₃ 10 mM pH 7,4, glucosa 20 mM, GSH 3 mM y ATP 2 mM. Al final de la etapa de diálisis, las suspensiones de GR se recogieron y dejaron estabilizar a 37 °C durante 5 minutos con una suave agitación. La liberación de eritrocitos se obtuvo mediante incubación de células con 0,1 volúmenes de solución hipertónica a 3000 mOsm que contenía inosina 100 mM, ATP 20 mM, glucosa 10 mM, piruvato de sodio 100 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 190 mM, KCl 1666 mM y NaH₂PO₄ 33 mM (pH 7,4). Los GR liberados se incubaron durante 25 minutos a 37 °C en presencia de la solución hipertónica para permitir la re-atemperación de los segmentos de la membrana y aumentar la recuperación celular final. Finalmente, los eritrocitos cargados se lavaron 2 veces en tampón fisiológico para retirar la fracción de FKBP12 no cargada del medio externo. El MCV de índices corpusculares de GR, *Volumen corpuscular medio*, MCH, *Hemoglobina corpuscular media* y MCHC, *Concentración de hemoglobina corpuscular media*) se evaluaron para tanto las células cargadas como no cargadas al final del procedimiento.

Estabilidad *in vitro* de eritrocitos cargados con FKBP12: se evaluó la estabilidad *in vitro* de eritrocitos cargados con FKBP12 hasta 6 días después del procedimiento de carga. Los GR cargados se resuspendieron a 0,5 % de hematocritos en RPMI-1640 suplementado con un 10 % de FBS, 50 μ g/ml de estreptomicina y 50 unidades/ml y se incubaron en una atmósfera humificada a 37 °C con un 5 % de CO₂. Se calculó en los tiempos 0, 1, 2, 3 y 6 días el porcentaje de células supervivientes. En detalle, se recogieron las suspensiones, se centrifugaron y las células del sedimento se re-suspendieron en una cantidad fijada de solución Hepes. Se evaluaron el volumen y los hematocritos de suspensiones de GR y la supervivencia celular se calculó para todas las muestras. En paralelo, se evaluaron el MCV, MCH y MCHC. Los eritrocitos no cargados, sometidos al mismo proceso de carga pero sin la adición de FKBP12 durante la etapa de diálisis, se usaron como control para la supervivencia celular y valoración de los parámetros de los glóbulos rojos.

Evaluación de la capacidad de unión de Tacrolimus adquirida por eritrocitos cargados con FKBP12: Los GR cargados con FKBP12 obtenidos al final del procedimiento de carga se resuspendieron en solución de Hepes en hematocrito fisiológico (40 %) y Prograf 5 mg/ml. Se añadió a continuación inyección concentrada a 20 μ g/ml de suspensión de GR para evaluar la nueva capacidad de unión de GR para el fármaco (se calculó la capacidad de unión de FK506 para GR nativos 0,4 μ g/ml de GR 40 % Ht). Las células se dejaron incubar durante 1 hora a 37 °C para permitir el equilibrio del fármaco entre los compartimentos intracelulares y extracelulares. A continuación se lavaron los eritrocitos con solución salina (pH 7,4) para retirar el Tacrolimus no unido del medio externo. Los GR nativos obtenidos a partir de sangre recién recogida en heparina a partir de donantes sanos se usaron como control durante el experimento.

La cantidad de Tacrolimus asociada con eritrocitos cargados con FKBP12 y nativos se evaluó a través de un analizador de dimensión RXL (RXL Dimension, Siemens, ex-Dade Behring). El analizador de dimensión mide los niveles de FK506 en muestras de sangre completa mediante un Ensayo inmunológico magnético conjugado de anticuerpo (ACMIA). El ensayo se realiza usando un cartucho de reactivo Flex. El cartucho Flex TACR contiene un reactivo de tratamiento previo, conjugado de anticuerpo de β -galactosidasa-FK506, FK506 inmovilizado sobre partículas de dióxido de cromo, sustrato clorofenol rojo β -D-galactopiranosido (CPRG) y diluyente para hidratar los comprimidos. Sangre completa (200 μ l) de un tubo de recogida EDTA, mezclada sobre un inversor, se añade en primer lugar a un recipiente para muestras por el operario. La Dimensión usa una sonda de ultrasonidos para mezclar la muestra, somete a lisis las células sanguíneas usando un tampón a base de saponina y sonicación y a continuación añade un conjugado de anticuerpo/ β -galactosidasa de FK506. La FK506 presente en la muestra se une mediante el reactivo conjugado con el anticuerpo de FK506. Se añaden las partículas magnéticas recubiertas con FK506 para unir el conjugado anticuerpo-enzima libre. La mezcla de reacción se separa a continuación magnéticamente. Después de la separación, el sobrenadante que contiene el complejo FK506-anticuerpo-enzima se transfiere a otra cubeta y se mezcla con el sustrato. La β -Galactosidasa cataliza la hidrólisis de CPRG para producir clorofenol rojo (CPR) que absorbe luz al máximo a 577 nm.

Carga de 125 -FKBP12 en GR humanos: para demostrar que la cantidad superior de FK506 unida al FKBP12-GR diseñado por ingeniería se debe a la presencia de cantidades en aumento de proteína, se realizó un procedimiento de cara con FKBP12 radiomarcada. En resumen, se obtuvo 125 I-FKBP12 a través de la yodación de residuo Tyr por medio de activación química de yodo de sodio (Perkin Elmer, Waltham, EE.UU.) con cloramina T (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.). El 125 -FKBP12 obtenido (actividad específica de 3045 cpm/ μ g) se encapsuló dentro de eritrocitos humanos a través de diálisis hipotónica y liberación isotónica realizadas en las mismas condiciones que se han informado anteriormente (20, 40 y 80 μ M proteína/ml de GR). Las células cargadas se sometieron a solubilización y oxidación de hemoglobina con, respectivamente, peróxido de hidrógeno y Soluble (Perkin Elmer, Waltham, EE.UU.) tal como se detalla en el Protocolo Perkin Elmer para la preparación de muestra y recuento de las muestras de sangre completas. Los lisatos de GR se añadieron a continuación con Cútel Plus de Centellador Emulsionante (Packard) y medición de radioactividad mediante Contador de Centelleo Líquido (Packard).

Resultados

Fabricación de una forma recombinante de FKBP12 humana: La FKBP12 marcado con His recombinante se expresó eficazmente en la cepa BL21(DE3) de *E. Coli* tal como se demostró mediante el SDS-page de homogenato bacteriano (Figura 2). La figura representa el SDS-PAGE de homogenato BL21(DE3) no inducido (carril 1) usado como control y homogenato BL21(DE3) inducido (carril 2). Después de la tinción con azul Coomassie, puede observarse claramente una banda de proteína en el carril 2, que está ausente en el control. Además, gracias a la alta afinidad del marcador de histidina para iones de níquel, se aisló 6His-FKBP12 mediante una única etapa de cromatografía de afinidad a partir de la agrupación de proteínas en el homogenato bacteriano. La FKBP12 purificada se analizó finalmente mediante electroforesis de gel de poliacrilamida y evaluación densiométrica para verificar el peso molecular y grado de pureza de la proteína obtenida. Mediante inmunoelectrotransferencia, las bandas de proteína se revelaron a continuación con anticuerpo policlonal frente a la aclaración de FKBP12 que la proteína purificada es efectivamente la Proteína de unión 12-kDa FK506. En la figura 3 se informa sobre el desarrollo por electroforesis de la FKBP12 final y la inmunotransferencia; ambos indican la presente de una banda única de 13-14 kDa y un nivel de pureza superior al 99 %.

Estudios de unión preliminares de rFKBP12-FK506: se verificó la capacidad de 6His-FKBP12 en unir el ligando FK506. En la figura 4, la exposición sobre película de rayos X de membrana de nitrocelulosa después de la reacción ECL muestra que la intensidad de señal de transferencia resulta directamente proporcional a la cantidad de proteína detectada, demostrando, de este modo, que la FKBP12 recombinante es capaz de unir Tacrolimus de un modo específico y dependiente de dosis.

Carga de FKBP12 recombinante en eritrocitos humanos y estabilidad de GR cargado con FKBP12: al final del procedimiento de carga se obtuvo una recuperación celular óptima para todas las condiciones de incubación con FKBP12. El porcentaje de células recuperadas resultó en 70, 67 y 67 % para GR dializado incubado con 20, 40 y 80 μM de concentración de FKBP12 respectivamente, completamente comparable con el calculado para eritrocitos no cargados (Figura 5). Además, se han investigado los índices de eritrocitos para células cargadas y no cargadas, revelando que FKBP12-GR posee valores MCV, MCH y MCHC completamente comparables con eritrocitos no cargados (Tabla 1); mediante comparación de GR tratados con células nativas, solo puede notarse una pequeña disminución en el volumen celular medio pero las concentraciones de hemoglobinas se encuentran en el intervalo de variabilidad. La supervivencia celular calculada para GR cargado con FKBP12 a 1,2, 3 y 6 días es igual o superior en todas las condiciones de carga en comparación con los eritrocitos no cargados, como se muestra en la figura 6. Las diferencias observadas en el porcentaje de supervivencia no puede atribuirse a la cantidad de proteína añadida a las suspensiones celulares en el tubo de diálisis. En la Tabla 2, se resumen los valores MCV, MCH y MCHC. Una vez más las diferencias no pueden atribuirse entre los eritrocitos cargados con FKBP12 y controles en los tiempos presentados. Además, los valores obtenidos entre los GR cargados no presentan variaciones significantes para concentraciones de FKBP12 en aumento. Finalmente, se observaron pequeñas reducciones en el contenido de hemoglobina y concentración de hemoglobina en todos los grupos el sexto día, probablemente debido al inicio de la hemólisis consecuente al procedimiento experimental.

Evaluación de la capacidad de unión de Tacrolimus adquirida por eritrocitos cargados con FKBP12: Se cuantificaron los niveles de Tacrolimus por medio de ensayo inmunoenzimático sobre gránulos de GR nativo y cargado con FKBP12. Los resultados, presentados en la figura 7, demuestran que los eritrocitos cargados con FKBP12 eran capaces de unir cantidades superior de fármaco en comparación con las células nativas. Además, el gráfico subraya cómo la cantidad de FK506 asociada con los glóbulos rojos cargados aumenta proporcionalmente a la concentración de FKBP12 añadida durante la etapa de diálisis. De hecho, los eritrocitos sometidos a diálisis con FKBP12 concentrada a 20, 40 y 80 μM eran capaces de unir una cantidad de fármaco equivalente a $3,5 \pm 2,0$, $6,0 \pm 2,6$ e $11,4 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$ de GR a 100 % de hematocritos respectivamente, exactamente 4, 6 y 11 veces mayor que el GR nativo ($1,0 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ de GR 100 % de Ht).

Carga de ^{125}I -FKBP12 en GR humanos: Se cargó ^{125}I -FKBP12 en eritrocitos humanos para demostrar que la proteína recombinante puede atraparse eficazmente gracias al procedimiento de carga. Mediante la diálisis de GR humano con proteína radiomarcada en la concentración de 20, 40 e 80 μM tal como se describe en la sección de Métodos, podría obtenerse una concentración de FKBP12 intraeritrocítica en aumento. En particular, en GR cargado con FKBP12 se lograron $3,5 \pm 2,5$, $7,4 \pm 5,4$ y $15,4 \pm 0,6$ nmoles por milímetro de GR empaquetado, respectivamente para células dializadas frente a 20, 40 e 80 μM de proteína (Figura 8).

Discusión

La transcripción y traducción de la construcción produce una proteína con la secuencia Met-Ala-6His-Val antes de los 108 aminoácidos que componen la proteína nativa. Los 9 aminoácidos adicionales proporcionan un aumento en el peso molecular de proteína final de al menos 1,3 kDa (de 12 kDa a 13-14 kDa) tal y como se ha demostrado por el análisis SDS-page realizado en la sección experimental. Sin embargo, la presencia del marcador de histidina hace el proceso de purificación realmente sencillo y rápido ya que solo requiere una etapa de cromatografía de afinidad. Además, el protocolo de purificación de etapa única proporciona un alto rendimiento y pureza, con aproximadamente 50 mg obtenidos a partir de 1L de cultivo de *E. Coli* más del 99 % de pureza. Finalmente, la presencia del marcador

de poli(histidina) no compromete el plegamiento y la funcionalidad de la proteína, tal como se ha demostrado en el ensayo de unión por transferencia puntual. Esta prueba también se demuestra en bibliografía, aunque los autores produjeron un FKBP12 recombinante con marcadores N-terminales "a base de His". [Wear MA 2006].

Respecto a la carga de FKBP12 en eritrocitos humanos por medios del método de diálisis hipotónica, la proteína se añadió directamente en el tubo de diálisis puesto que la entrada de sustancias de alto peso molecular parece ser favorecido mientras que alcanza el equilibrio osmótico. En las tres concentraciones evaluadas (20, 40 y 80 μ M), La FKBP12 no parece hemolítica y la recuperación celular fue óptica en todas las condiciones, revelando que era completamente independiente de la presencia y concentración de FKBP12.

La evaluación de la estabilidad *in vitro* de GR cargado con FKBP12 mostró que no existían diferencias entre las curvas de supervivencia de eritrocitos cargados en comparación con las células no cargadas, sugiriendo que el excedente de proteína no disminuye la vitalidad celular. Finalmente, se investigaron los eritrocitos cargados por su capacidad de unir Tacrolimus. Se demostró una capacidad sorprendentemente superior de FK506 para GR cargado con FKBP12 en comparación con el GR nativo (utilizado como control durante los experimentos). Además, se demostró que la cantidad de fármaco asociado con los glóbulos rojos depende estrechamente de la concentración de proteína añadida a las suspensiones de GR en la etapa de diálisis. Puesto que la unión fármaco-proteína es estequiométrica en la proporción 1: 1, Parece probable que la concentración de FK506 se encuentra en relación directa con la concentración de FKBP12 dentro de los glóbulos rojos. Además, comparando las concentraciones de fármaco esperadas en eritrocitos derivados de los experimentos empleando FKBP12 radiomarcada (Tabla 3) con aquellas medidas en las pruebas de capacidad de unión de FK506, se encontraron concentraciones de Tacrolimus intraeritrocítico muy similares.

Por tanto, se ha demostrado que:

- 1) es posible encapsular FKBP12 dentro de eritrocitos humanos;
- 2) la encapsulación es dependiente de dosis; y
- 3) un atrapamiento de FKBP12 superior se corresponde con una concentración de FK506 intraeritrocítico superior; de hecho, los glóbulos rojos cargados con cantidades de FKBP12 en aumento (20, 40 y 80 μ M) fueron capaces de unir una cantidad de fármaco 4, 6 y 11 veces superior que las células nativas.

Los GR procesados de la presente invención evitan el metabolismo hepático prematuro y, mediante el uso de eritrocitos autólogos como vehículo, se evitan reacciones anafilácticas.

Bibliografía:

1. Armenti VT, Moritz MJ, Davison JM. Drug safety issues in pregnancy following transplantation and immunosuppression: effects and outcomes. *Drug Saf.* 1998 Sep;19(3):219-32.
2. Chow FS, Piekoszewski W, Jusko WJ. Effect of haematocrit and albumin concentration on hepatic clearance of tacrolimus (FK506) during rabbit liver perfusion. *Drug Metab Dispos.* 1997 May;25(5):610-6.
3. Ciancio G, Burke GW, Roth D, Miller J. Tacrolimus and mycophenolate mofetil regimens in transplantation: benefits and pitfalls. *Biodruga* 1999 Jun; 1(6):395-407.
4. Flower R. Erythrocyte Movement in the Capillaries. Macula Meeting 16-17 January 2009 in New York University School of Medicine, Nueva York.
5. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K, Navia MA. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell.* 1995 agosto 11;82(3):507-22.
6. Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007 Oct;22(5):328-35. Review.
7. Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996; 62:920-6.
8. Magnani M, Rossi L, Bianchi M, Serafini G, Zocchi E, Laguerre M, Ropars C. Improved stability of 2,3-bisphosphoglycerate during storage of hexokinase-overloaded erythrocytes. *Biotechnol Appl Biochem* 1989; 11:439-44.
9. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000 Feb;59(2):323-89.
10. Shaw LM, Holt DW, Keown P, Venkataramanan R, Yatscoff RW. Current opinions on therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Clin Ther.* 1999 Oct;21(10):1632-52; discussion 1631.
11. Tsunoda SM, Aweeka FT. Drug concentration monitoring of immunosuppressive agent: focus on tacrolimus, mycophenolate mofetil and sirolimus. *Biodrugs*, 2000 Dec; 14(6):355-69.
12. Undre NA. Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 May;18 Suppl 1:i 12-5. Review.
13. Walensky LD, Gascard P, Fields ME, Blackshaw S, Conboy JG, Mohandas N, Snyder SH. The 13-kD FK506 binding protein, FKBP13, interacts with a novel homologue of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *J Cell Biol.* 1998 Abr 6;141(1):143-53.
14. Wear MA, Patterson A, Walkinshaw MD. A kinetically trapped intermediate of FK506 binding protein forms in

vitro: chaperone machinery dominates protein folding in vivo. Protein Expr Purif. 2007 enero;51(1):80-95. Epub 2006 enero 28.

Tabla 1 - Volumen corpuscular medio (MCV), Hemoglobina corpuscular media (MCH) y Concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) de GR cargado con FKBP12 frente a GR no cargado y nativo.

	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
Valores de referencia	83-97	27-32	32-36
GR nativo	89 ± 1,6	29,6 ± 0,6	33,2 ± 0,4
GR no cargado	78 ± 2,2	24,9 ± 0,9	31,9 ± 0,9
FKBP12-GR 20 µM	78 ± 1,3	24,5 ± 0,6	31,3 ± 0,6
FKBP12-GR 40 µM	78 ± 2,9	24,6 ± 0,7	31,4 ± 1,0
FKBP12-GR 80 µM	79 ± 1,1	24,8 ± 0,3	31,3 ± 0,7

Los resultados que se muestran en la tabla superior son los promedios aritméticos y las desviaciones estándar de cinco experimentos de carga.

Tabla 2 - Valores MCV, MCH y MCHC en 6 días para FKBP12-cargada dentro a GR NC

	GR no cargado			FKBP12-GR 20 µM		
Tiempo (días)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
0	73	28,2	38,3	74	28,7	38,6
1	74	28,3	38,2	75	29,1	38,9
2	74	28,4	38,4	74	28,4	38,3
3	73	28,2	38,8	74	28,5	38,5
6	72	23,8	33,2	73	26,3	35,8
	73,2	27,4	37,4	74,0	28,2	38,0
<i>Desv.Estándar</i>	0,8	2,0	2,3	0,7	1,1	1,3
	FKBP12-GR 40 µM			FKBP12-GR 80 µM		
Tiempo (días)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
0	74	28,8	38,9	73	28,3	38,4
1	75	29,6	39,7	74	28,6	38,4
2	74	28,4	38,4	73	29,3	39,9
3	73	27,9	38,1	74	28,3	38,5
6	74	27,3	36,9	74	27,3	36,9
<i>Promedio</i>	74,0	28,4	38,4	73,6	28,4	38,4
<i>Desv.Estándar</i>	0,7	0,9	1,0	0,5	0,7	1,1

En la tabla se resumen los valores de MCV, MCH y MCHC obtenidos para GR cargado con FKBP12 (20, 40 y 80 µM) en los tiempos 0, 1, 2, 3 y 6 días después del tratamiento en comparación con aquellos encontrados para GR no cargado. En la parte inferior se informa de los valores promedio y las desviaciones estándar calculadas para cada muestra durante el tiempo de incubación.

Tabla 3: Encapsulación de rFKBP12 y la capacidad total de eritrocitos cargados para unir FK506 (última columna a la derecha) y la contribución absoluta debido a la presente de FKBP12 recombinante (penúltima columna a la derecha)

	Concentración de rFKBP12 (nmol/ml de GR 100%Ht)	Concentración de FK506 (µg/ml de GR 100%Ht)	Concentración total de FK506 (µg/ml de GR 100%Ht)
GR nativo	0	0	1,1 ± 0,4
GR FKBP12 20µM	3,5 ± 2,5	2,8 ± 2,0	3,9 ± 2,4
GR FKBP12 40µM	7,4 ± 5,4	5,9 ± 4,3	7,0 ± 4,7
GR FKBP12 80µM	15,5 ± 0,6	12,5 ± 0,5	13,6 ± 0,9

Los resultados que se muestran en la tabla superior son los promedios aritméticos y las desviaciones estándar de tres experimentos de carga.

Ejemplo 2

CICLOFILINA-CICLOSPORINA

Materiales y métodos

Fabricación de una forma recombinante de Ciclofilina A humana: Se ha fabricado una forma recombinante de Ciclofilina A humana (CypA) como sigue. Se extrajo el ARN total de células HeLa y a continuación se obtuvo ADNc mediante retro-transcripción con cebador oligo-dT. La codificación de ADNc para el gen de CypA (número de referencia del banco de genes NM_021130.3) se amplificó mediante PCR con un par de cebadores degenerados (Directo 5'-TATTAGCCCACGTGAACCCACCGTGTCTTCG-3' (SEQ ID NO: 4) e Inverso 5'-AACACAAGGGATCCTTATTCGAGTTGTCCAC-3' (SEQ ID NO: 5)) y el amplicón secuenciado en ambas direcciones con un secuenciador cepilar para confirmar la correcta identidad del producto PCR. El ADNc de CypA obtenido se digirió finalmente con BamHI y PmlI y se ligó en el vector pET-45b(+) aguas abajo de la secuencia de codificación de marcador de poli(histidina) para producir una CypA marcada con His N-terminal, tal como se informa para la fabricación de FKBP12 en el anterior ejemplo.

ATGGCACATCACCACCACCATCACGTGAACCCACCGTGTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCC
TTGGGCCGCGTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGAAAATTTTCGTGCTCTG
AGCACTGGAGAGAAAGGATTTGGTTATAAGGGTTCTTGCTTTACAGAAATTATCCAGGGTTTATGTGT
CAGGGTGGTGACTTCACACGCCATAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAAATTTGAAGAT
GAGAACTTCATCCTAAAGCATACGGGTCTTGGCATCTTGTTCCATGGCAAATGCTGGACCCAACACAAAT
GGTTCACAGTTTTTTCATCTGCAGTCCCAAGACTGAGTGGTGGATGGCAAGCATGTGGTGTGGTGGCAAA
GTGAAAGAAGGCATGAATATTGTGGAGGCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGACCAGCAAG
AAGATCACCATTTGCTGACTGTGGACAACCTCGAATAA (SEQ ID NO: 6)

Las células competentes de *E. Coli* BL21(DE3) se transformaron con la construcción de pET45b-CypA y se cultivaron en un medio LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C; cuando el cultivo O.D alcanzó 0,6-0,7, se indujo la expresión de la CypA recombinante mediante procedimiento estándar y el cultivo se continuó durante 2 horas más. Los BL21(DE3) inducidos se homogeneizaron posteriormente en tampón de lisis y la proteína recombinante se purificó hasta la homogeneidad a través de cromatografía de afinidad de Ni tal como se ha descrito anteriormente. Las fracciones eluidas se re-unieron después del análisis SDS-page y se dializaron contra 2 litros de tampón de almacenamiento (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 20 mM, DTT 0,5 mM, glicerol 10 %). La pureza final de la CypA recombinante se verificó mediante electroforesis sobre un 15 % de gel de acrilamida y tinción con azul Coomassie y mediante inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal con marcador anti-histidina de ratón (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido).

Carga de 125 I-CypA en GR humanos: La CypA recombinante se radiomarcó con yodo-125 de sodio a través del método de cloramina-T para cuantificar la cantidad de proteína atrapada dentro de los eritrocitos. Se encapsuló 125 I-CypA (actividad específica 695 cpm/µg) dentro de eritrocitos humanos por medio del procedimiento de diálisis hipotónica, liberación isotónica y "reatemperación" descritos en el ejemplo anterior. En particular, se procesaron GR

humanos al 70 % de hematocritos en solución fisiológica con 125 I-CypA a concentraciones en aumento (20, 40, 80 μ M). Cada suspensión de eritrocito se dializó en un tubo de diálisis separado con un corte de 3,5 kDa, frente 50 volúmenes de solución hipotónica durante 90 minutos a 4 °C. Se obtuvo la liberación de eritrocitos obtenidos mediante incubación de las células procesadas con 0,1 volúmenes de solución hipertónica e incubación durante 25 minutos a 37 °C. Las células cargadas se trataron con peróxido de hidrógeno y Soluble (Perkin Elmer, Waltham, EE.UU.) y se sometieron a recuento de emisión- β con Recuento de Centello Líquido (Packard) para cuantificar la cantidad de radioactividad atrapada.

Estudios de unión de rCypA-CsA: La CypA marcada con His (18 kDa) se investigó a continuación por su capacidad de unir Ciclosporina A (1202.6 amu) mediante fraccionamiento centrífugo del complejo proteína-fármaco (que permanece en las unidades de filtro centrífugo, corte 10 kDa) a partir del fármaco libre que se recupera en el ultrafiltrado. En resumen, se dejó producir la unión CypA-CsA mediante la incubación de la proteína y fármaco a una relación molar de 1:1 durante 1h a 37 °C; a continuación, la mezcla se centrifugó en unidades de filtro Amicon Ultra (10 kDa) (Millipore, Irlanda) de acuerdo con las instrucciones de producto. La concentración de fármaco se detectó a continuación mediante HPLC tanto sobre el ultrafiltrado como en el rCypA que contenía la solución. Una muestra que contenía la molécula de CsA sola se filtró del mismo modo y se usó como control.

Carga de CypA recombinante dentro de eritrocitos humanos y evaluación de la capacidad de unión de CsA adquirida mediante eritrocitos cargados con CypA: se ha cargado CypA dentro de GR humanos por medio de la diálisis hipotónica y método de liberación isotónica tal como se ha informado en la sección "*Carga de 125 I-CypA dentro de GR humanos*". Se usaron GR no cargados, (es decir, sometidos al mismo proceso sin la adición de proteína) como control para la estimación de recuperación celular y evaluación de índices corpusculares de GR. Los GR cargados con CypA obtenidos a partir del procedimiento de carga se re-suspendieron a continuación en una solución salina tamponada con Hepes al 40 % de hematocritos y se añadió con CsA para probar la capacidad de unión de los GR. Se disolvió CsA (LC Laboratories, Woburn, EE.UU.) en etanol (10 mg/ml) y se añadió a las células en la concentración de 20 μ g/ml de suspensión de GR. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C para permitir el equilibrio del fármaco y a continuación se lavó con tampón salino para retirar la CsA no unida. Los GR no cargados se usaron como control durante el experimento de unión de CsA.

Análisis HPLC: se ha evaluado la cantidad de CsA asociada con eritrocitos cargados con CypA y nativos a través del método HPLC precedido por un procedimiento de extracción de fase sólida (SPE). En resumen, Las muestras de GR obtenidas al final de los estudios de capacidad de unión se sometieron a lisis y desproteinización con una solución de ZnSO_4 acuosa y acetona tal como se informa en [Baldelli S 2005]. Las sobrenadantes aclarados se cargaron a continuación sobre cartuchos C 18 de Isoluto (International Sorbent Technology, Tucson, EE.UU.) para aclarar adicionalmente los extractos. Se usó Ciclosporina D (CsD) como estándar interno durante el procedimiento de extracción para evaluar el porcentaje de recuperación de cada muestra (Figura 9). Los desarrollos cromatográficos se realizaron sobre columnas C8 en condiciones isocráticas tal como se describe en [Baldelli S 2006] con algunas modificaciones. La columna analítica, C8 150x4,6 mm empaquetada con perlas de Extrasil de 3 μ m (Teknokroma, Barcelona, España), se calentó a 75 °C, la fase móvil consistía en un 70 % de CH_3CN en agua de grado HPLC y se bombeó a un caudal de 0,7 ml/min durante la duración de desarrollo total (10 minutos) y el detector UV (Varian 9050, Varian Inc., Palo Alto, EE.UU.) se estableció a 210 nm. Los datos se procesaron usando un software Jasco-Borwin (Jasco Inc., Easton, EE.UU.).

Resultados y discusión

Fabricación de una forma recombinante de Ciclofilina A humana: La CypA marcada con His recombinante se expresó muy eficazmente en la cepa BL21(DE3) de *E. Coli* tal como se demostró por la **figura 10** que representa los homogenatos bacterianos SDS-PAGE de BL21(DE3). La tinción con azul Coomassie reveló una banda de proteína de aproximadamente 18-19 kDa que parece aumentar después de la inducción IPTG. De hecho, la CypA recombinante producida contiene los 8 aminoácidos adicionales Met- Ala-(His) $_6$, aguas arriba a la secuencia de proteína de Ciclofilina A nativa, en la que el iniciador Met se eliminó [Gevaert K 2003, [http://www.uniprot.org/blast/?about=P62937\[2-28\]](http://www.uniprot.org/blast/?about=P62937[2-28])], y esto resulta en un aumento de peso molecular de aproximadamente 1kDa (de 18 a 19 kDa).

La CypA marcada con His inducida se ha aislado fácilmente del homogenato bacteriano mediante cromatografía de afinidad Nichel resultando en un muy alto rendimiento (aproximadamente 79 mg por litro de cultivo de *E. Coli*). Además, la caracterización de la proteína purificada a través de electroforesis de gel de poliacrilamida e inmunotransferencia, que se muestra en la **figura 10**, demuestra un nivel de pureza óptimo. De hecho, el desarrollo electroforético de la CypA final muestra la presencia de una única banda con una movilidad electroforética de aproximadamente 18-19 kDa y un nivel de pureza superior al 99 %, mientras que la inmunotransferencia certifica la identidad de la proteína purificada.

Carga de 125 I-CypA en GR humanos: al final del procedimiento se ha recuperado una radioactividad creciente en las muestras de GR cargados con concentraciones de 125 I-CypA en aumento demostrando que la CypA recombinante puede cargarse en GR humanos de un modo dependiente de dosis. La **figura 11** muestra las concentraciones intraeritrocíticas en aumento de CypA alcanzados en las tres condiciones de carga (3,97, 5,00 y

15,85 nmol/ml de GR 100 % de hematocritos, respectivamente, para GR sometidos a diálisis con 20, 40 y 80 μ M de CypA).

Estudios de unión de rCypA-CsA: los experimentos descritos en la sección de métodos nos llevan a la conclusión que la CypA recombinante es capaz de unir ligando de CsA. De hecho, cuando la CsA se ha centrifugado en la presencia de CypA más del 70 % del fármaco completo se ha recuperado en la fracción no filtrada, mientras que cuando la CsA se ha centrifugado sola, se encontró solo el 15 % de ciclosporina en la parte superior, sugiriendo que el fármaco se retiene a consecuencia de la unión con la proteína. De modo que la presencia del marcador de poli(histidina) para no comprometer la funcionalidad de la proteína.

Caracterización de GR cargado con rCypA: respecto a la producción de GR diseñado por ingeniería con cantidades superior de ciclofilina intracelular, se obtuvo una recuperación celular óptima para el GR cargado con CypA resultando respectivamente en el 67, 69 e 67 por ciento de GR sometido a diálisis incubado con 20, 40 e 80 μ M de CypA, claramente similar al obtenido para eritrocitos sometidos a diálisis en ausencia de la proteína (68 %). Estos datos demuestran que la recuperación celular no se ve afectada por la presencia y concentración de CypA. También la evaluación de los índices corpusculares de GR (MCV, MCH, MCHC) revelaron valores para eritrocitos cargados con CypA de acuerdo con aquellos de las células no cargadas (NC) (Tabla 2).

Evaluación de la capacidad de unión de Ciclosporina A adquirida por eritrocitos cargados con CypA: Los GR cargados con CypA y no cargados se investigaron finalmente por su capacidad de unión frente a la Ciclosporina. Las células se han incubado con el fármaco y a continuación procesado para la cuantificación de los niveles de CsA a través de análisis HPLC. Los resultados ilustrados mediante el histograma en la figura 11 demuestra que los eritrocitos cargados con CypA fueron capaces de unir cantidades superior de CsA en comparación con las células no cargadas y que la cantidad de fármaco asociado con los GR cargados depende de la concentración de proteína añadida durante la etapa de diálisis. Actualmente, Los GR sometidos a diálisis con 20, 40 y 80 μ M de CypA demostraron ser capaces de unir una cantidad de fármaco equivalente a 8,9, 12,2 y 17,0 μ g/ ml de GR al 100 % de hematocritos, respectivamente, mientras que los GR no cargados fueron capaces de transportar únicamente 3,3 μ g de CsA por mililitro de GR empaquetado. Mediante la comparación de los resultados que se muestran anteriormente con aquellos presentados en la bibliografía sobre eritrocitos nativos (43×10^{-5} nmol de CsA por 10^6 de GR [Foxwell BM 1988, Reichel C 1994], que es equivalente a 5 μ g de CsA por milímetro de GR empaquetado) es evidente que los GR cargados con CypA poseen una capacidad de unión claramente superior para la CsA en todas las condiciones de carga.

En conclusión, los datos que ahora se exponen, demuestran que:

- 1) es posible encapsular CypA dentro de eritrocitos humanos;
- 2) la encapsulación es dependiente de dosis; y
- 3) un atrapamiento de CypA superior se corresponde con una concentración de CsA intraeritrocítica superior; de hecho, los glóbulos rojos cargados con cantidades de CypA en aumento (20, 40 y 80 μ M) fueron capaces de unir una cantidad de fármaco 3, 4 y 5 veces superior que las células no cargadas y 1,8, 2,4 y 3 veces mayor en comparación con las células nativas.

Tabla 4 - Índices corpusculares de GR cargados con CypA frente a GR no cargados y GR nativo

	MCV	MCH	MCHC
ND	90 $\pm$ 2,1	34,1 $\pm$ 1,0	38,1 $\pm$ 1,3
UL	80 $\pm$ 2,2	28,7 $\pm$ 0,9	36,0 $\pm$ 1,1
L1	78 $\pm$ 1,9	28,1 $\pm$ 0,8	36,1 $\pm$ 0,9
L2	79 $\pm$ 2,1	28,0 $\pm$ 1,1	35,7 $\pm$ 1,5
L3	77 $\pm$ 3,9	27,3 $\pm$ 1,6	35,6 $\pm$ 1,3

En la tabla se comparan los valores de MCV, MCH y MCHC mostrados por los GR cargados con CypA con aquellos de células no cargadas y nativas. Los valores presentados son desviaciones medias y estándar a partir de los cuatro experimentos de carga.

Referencias del Ejemplo 2:

1. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)¹ in organ transplantation. Drugs 2001; 61(13):1957-2016.

2. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 1993; 45(6):953-1040.
3. Pollard S, Nashan B, Johnston A, Hoyer P, Belitsky P, Keown P, Helderma H. A pharmacokinetic and clinical review of the potential clinical impact of using different formulations of cyclosporin A. Berlin, Alemania, 19 de noviembre de 2001. *Clin Ther.* 2003; 25(6):1654-1669.
- 5 4. Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. From pharmacokinetics to pharmacogenomics: a new approach to tailor immunosuppressive therapy. *Am.J Transplant.* 2004; 4(3):299-310.
5. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J.Am.Soc.Nephrol.* 2009; 4(2):481-508.
- 10 6. Foxwell BM, Frazer G, Winters M, Hiestand P, Wenger R, Ryffel B. Identification of cyclophilin as the erythrocyte cyclosporin-binding protein. *Biochim.Biophys.Acta* 3-3-1988; 938(3):447-455.
7. Reichel C, von FM, Brockmeier D, Dengler HJ. Characterization of cyclosporine A uptake in human erythrocytes. *Eur.J Clin Pharmacol.* 1994; 46(5):417-419.
- 15 8. Baldelli S, Murgia S, Merlini S, Zenoni S, Perico N, Remuzzi G, Cattaneo D. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for therapeutic drug monitoring of everolimus. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 25-2-2005; 816(1-2):99-105.
9. Baldelli S, Zenoni S, Merlini S, Perico N, Cattaneo D. Simultaneous determination of everolimus and cyclosporine concentrations by HPLC with ultraviolet detection. *Clin Chim.Acta* 2006; 364(1-2):354-358.
- 20 10. Gevaert K, Goethals M, Martens L, Van DJ, Staes A, Thomas GR, Vandekerckhove J. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat.Biotechnol.* 2003; 21(5):566-569.

REIVINDICACIONES

1. Un glóbulo rojo modificado, en el que la modificación comprende un complejo de asociación que comprende un fármaco y una proteína transportadora recombinante para el fármaco, en el que la forma no complejada del fármaco es capaz de atravesar la membrana del glóbulo rojo y en el que la proteína transportadora recombinante no complejada es una inmunofilina.
5
2. Un glóbulo rojo modificado según la reivindicación 1, en el que el fármaco es un agente inmunosupresor o antiviral asociado capaz de unir dicha inmunofilina.
10
3. Un glóbulo rojo modificado según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína transportadora recombinante es FKBP12 y el fármaco es Tacrolimus (FK506) o Rapamicina, o en el que la proteína es Ciclofilina y el fármaco es Ciclosporina.
4. Un glóbulo rojo modificado según la reivindicación 2, en el que el inmunosupresor es capaz de inhibir la activación de la calcineurina fosfatasa mediante la formación de un complejo con calcineurina y la inmunofilina.
15
5. Un glóbulo rojo modificado según las reivindicaciones 2 o 4, en el que la inmunofilina es FKBP12.
6. Un glóbulo rojo modificado según las reivindicación 2 o 4, en el que la inmunofilina es ciclofilina.
20
7. Un glóbulo rojo modificado según cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, en el que el inmunosupresor es un inhibidor de calcineurina.
8. Un glóbulo rojo modificado según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de FK506 (Tacrolimus) o Ciclosporina.
25
9. Un glóbulo rojo modificado según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el glóbulo rojo es del grupo sanguíneo O y Rhesus negativo.
10. Un glóbulo rojo modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento o la profilaxis de cáncer o infecciones virales, comprendiendo dichos tratamiento o profilaxis la administración de los glóbulos rojos modificados a un paciente que lo necesita.
30
11. Un glóbulo rojo modificado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la inmunosupresión, comprendiendo dicha inmunosupresión la administración de los glóbulos rojos modificados a un paciente que requiere inmunosupresión.
35
12. Un glóbulo rojo modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de reducción de la concentración de un fármaco seleccionado en un fluido corporal del paciente, que comprende la administración de los glóbulos rojos modificados cargados con las proteínas transportadoras asociadas capaces de formar complejos de afinidad con el fármaco seleccionado reduciendo de este modo la actividad o la biodisponibilidad del fármaco.
40

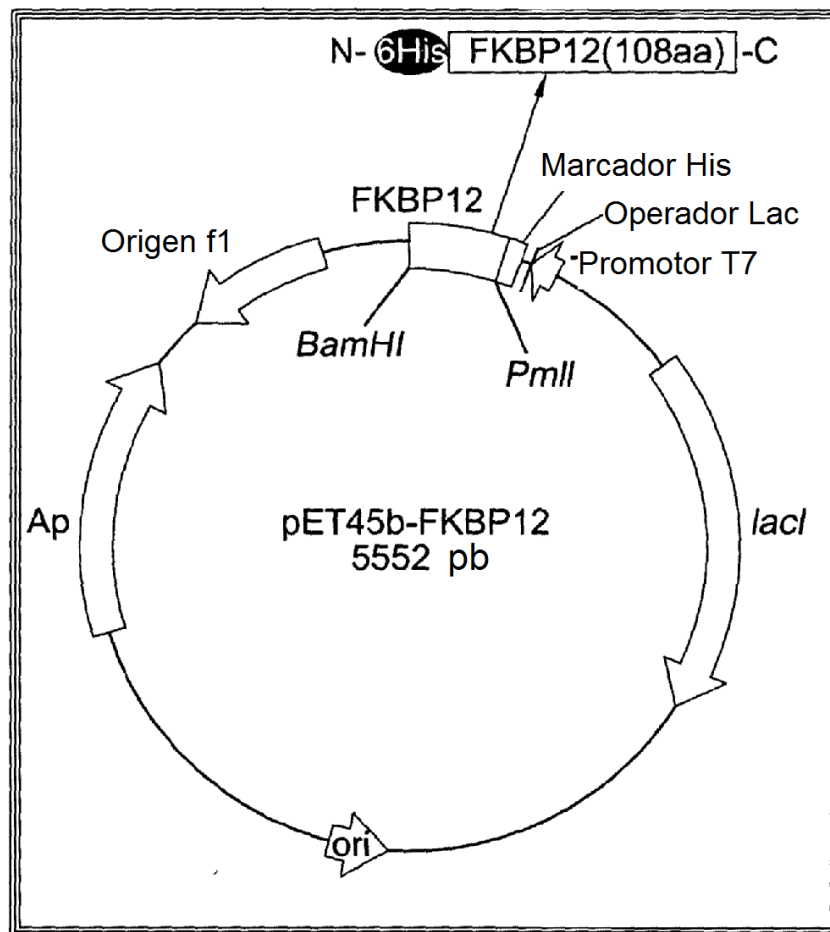


Fig. 1
construcción pET-45b (+)-FKBP12

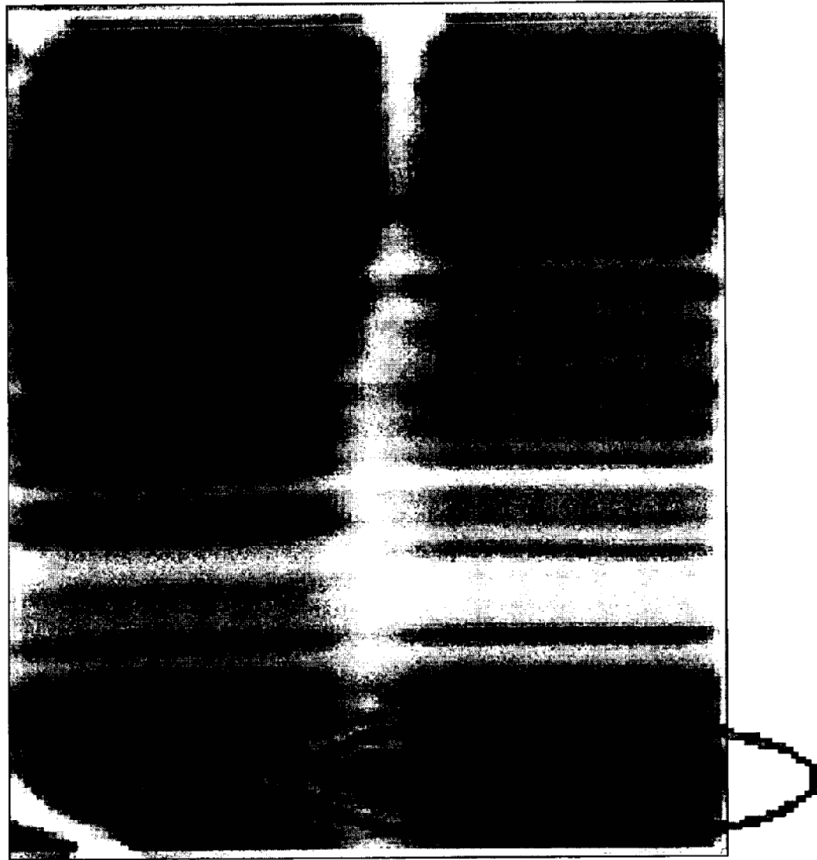


Fig. 2
Homogenatos de SDS-page de BL21 (DE3)

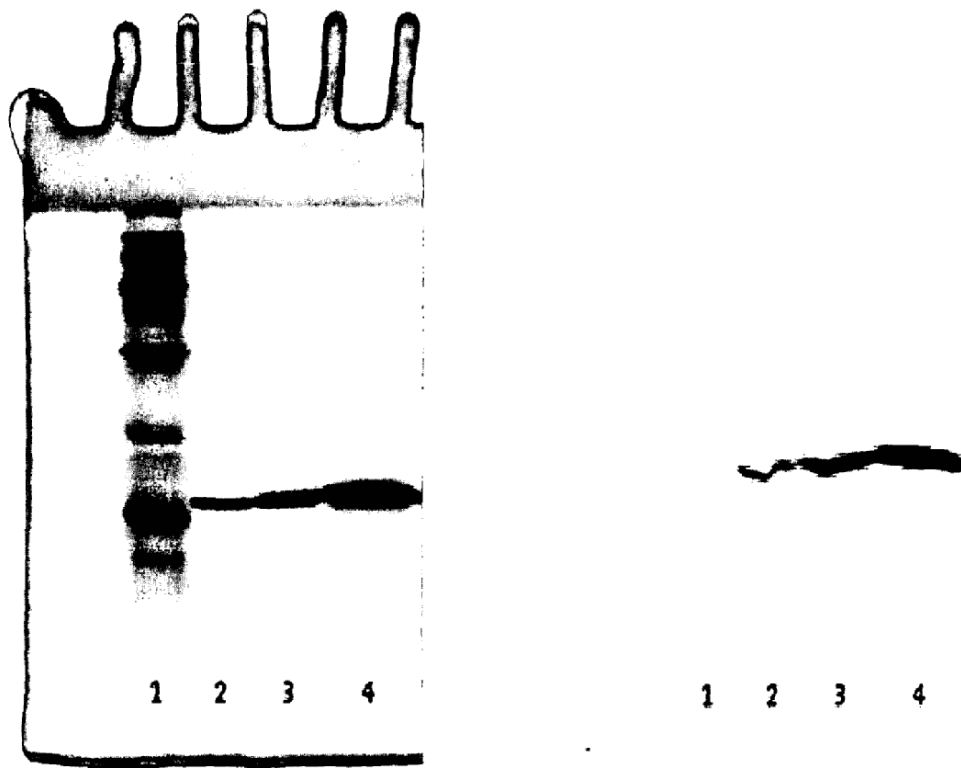


Fig. 3

Caracterización de FKBP12 purificada a) SDS-PAGE b) inmunotransferencia

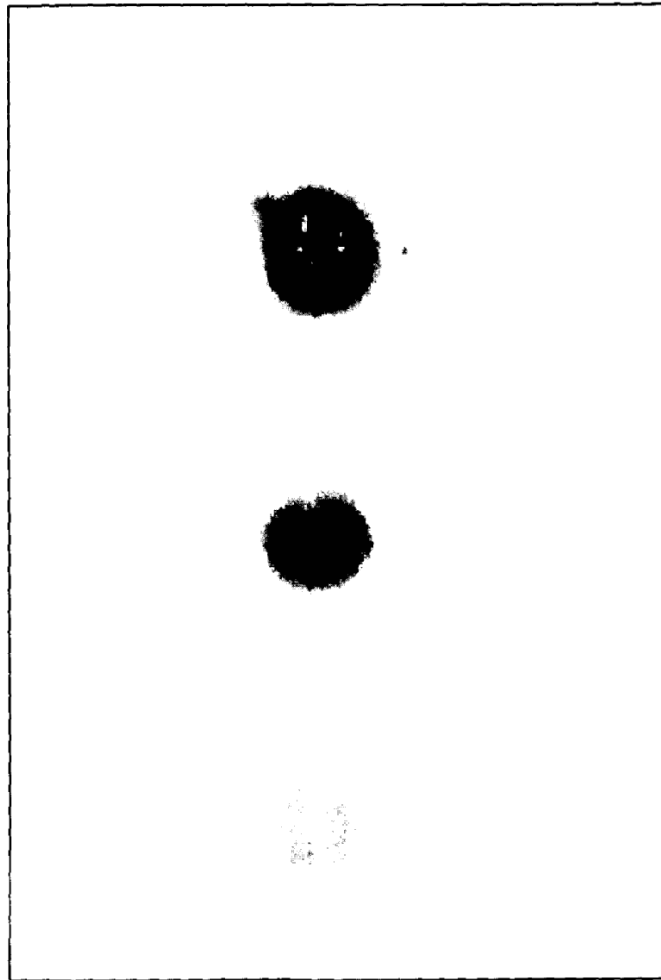


Fig.4

Análisis por transferencia puntual de unión de rFKBP12-FK506

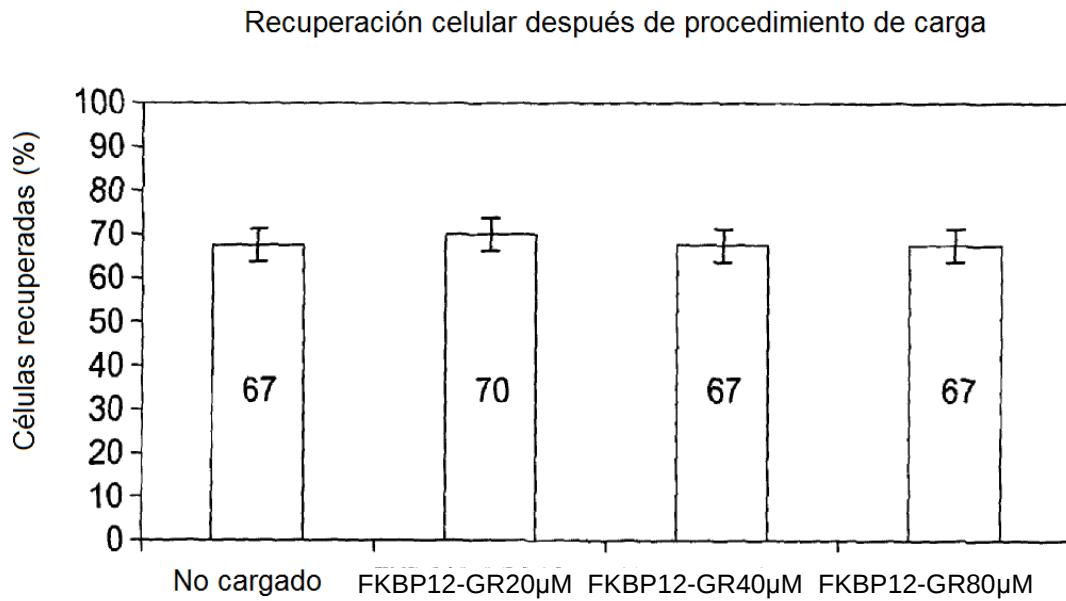


Fig. 5
Recuperación celular

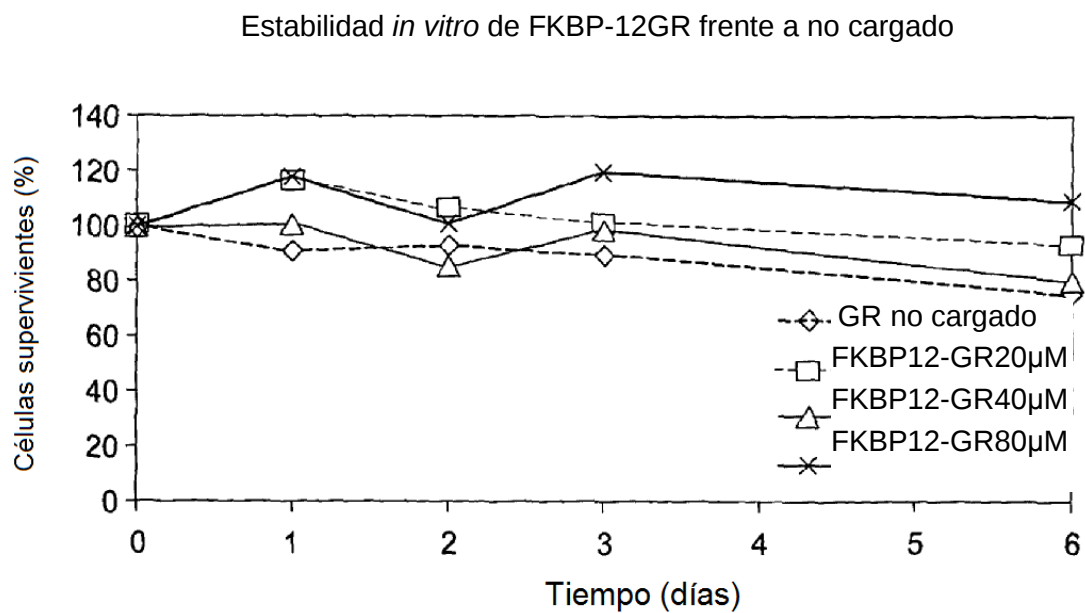


Fig. 6
Curva de supervivencia de GR cargados con FKBP-12

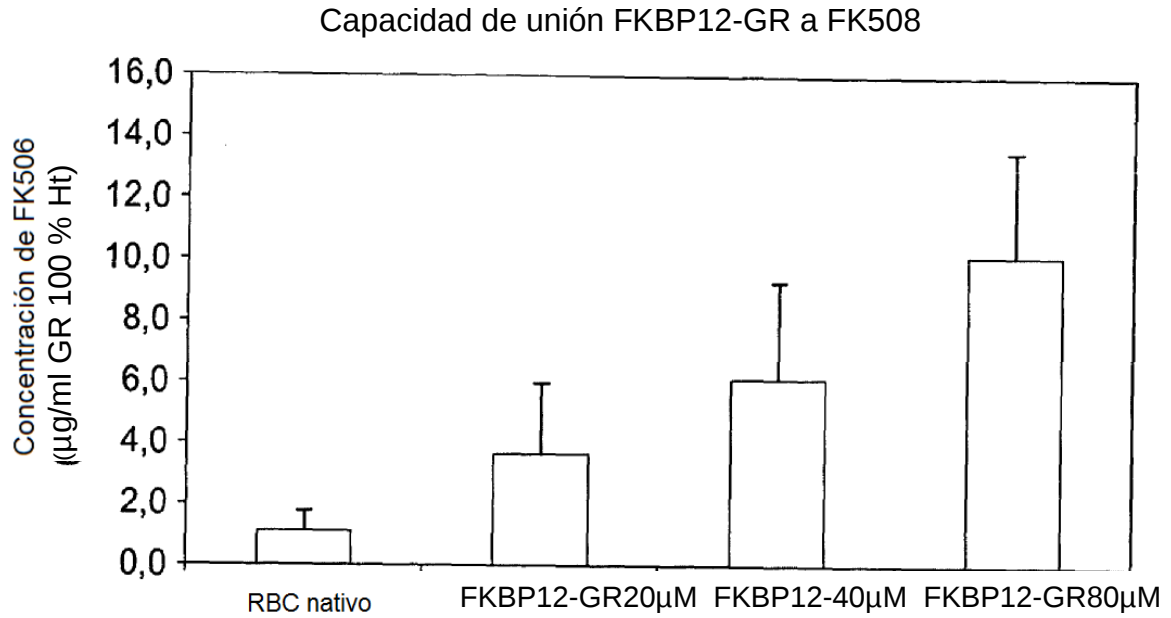


Fig. 7

Capacidad de unión GR cargado con FKBP12-GR a FK508 para Tacrolimus

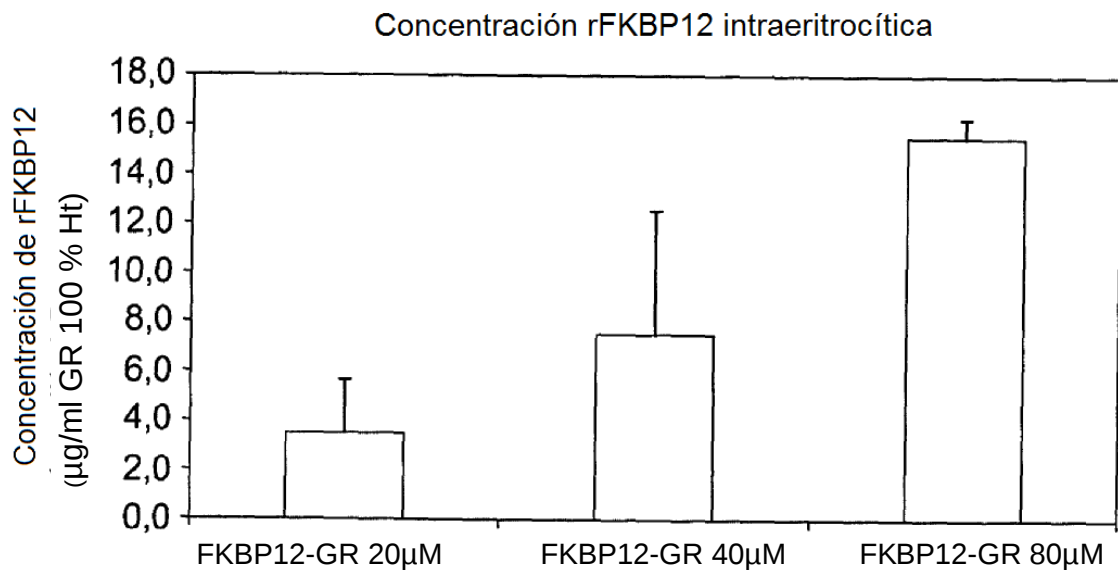


Fig. 8

Concentración de FKBP12 recombinante en GR modificado por ingeniería

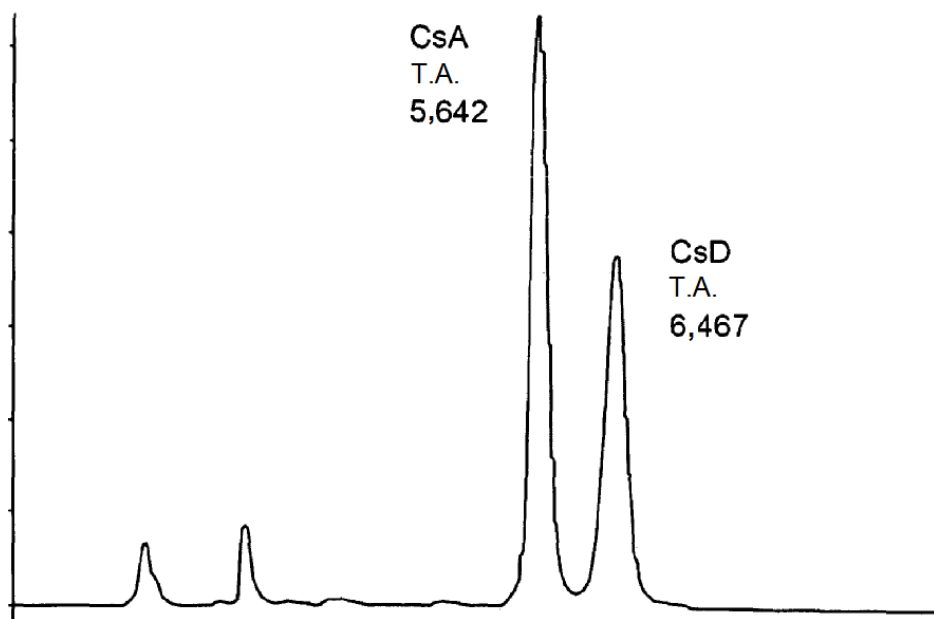


Fig. 9
Cromatograma CsA y CsD de HPLC

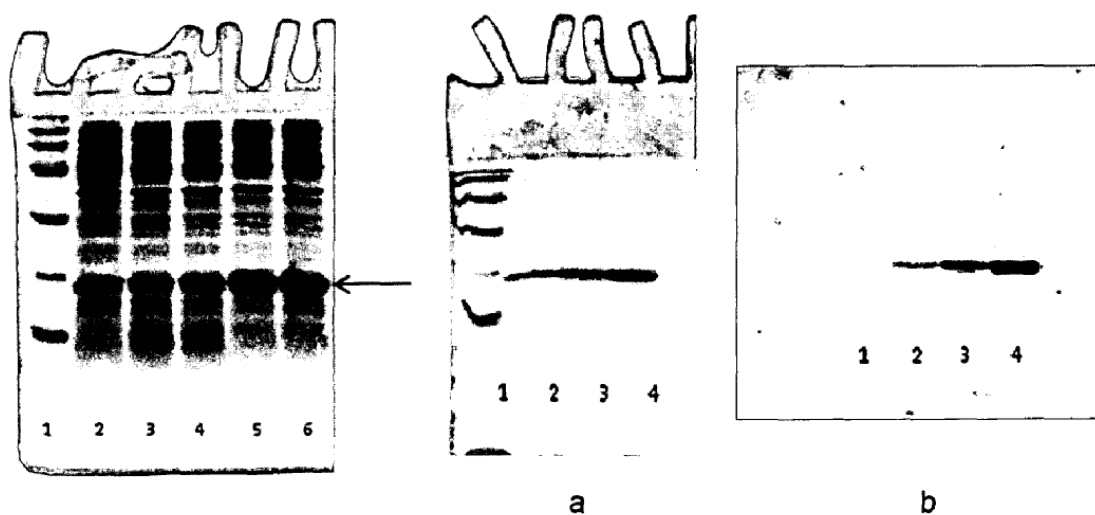


Fig. 10
SDS-PAGE de homogenatos BL21 (DE3) inducidos y CypA purificada
a) SDS-PAGE b) inmunotransferencia

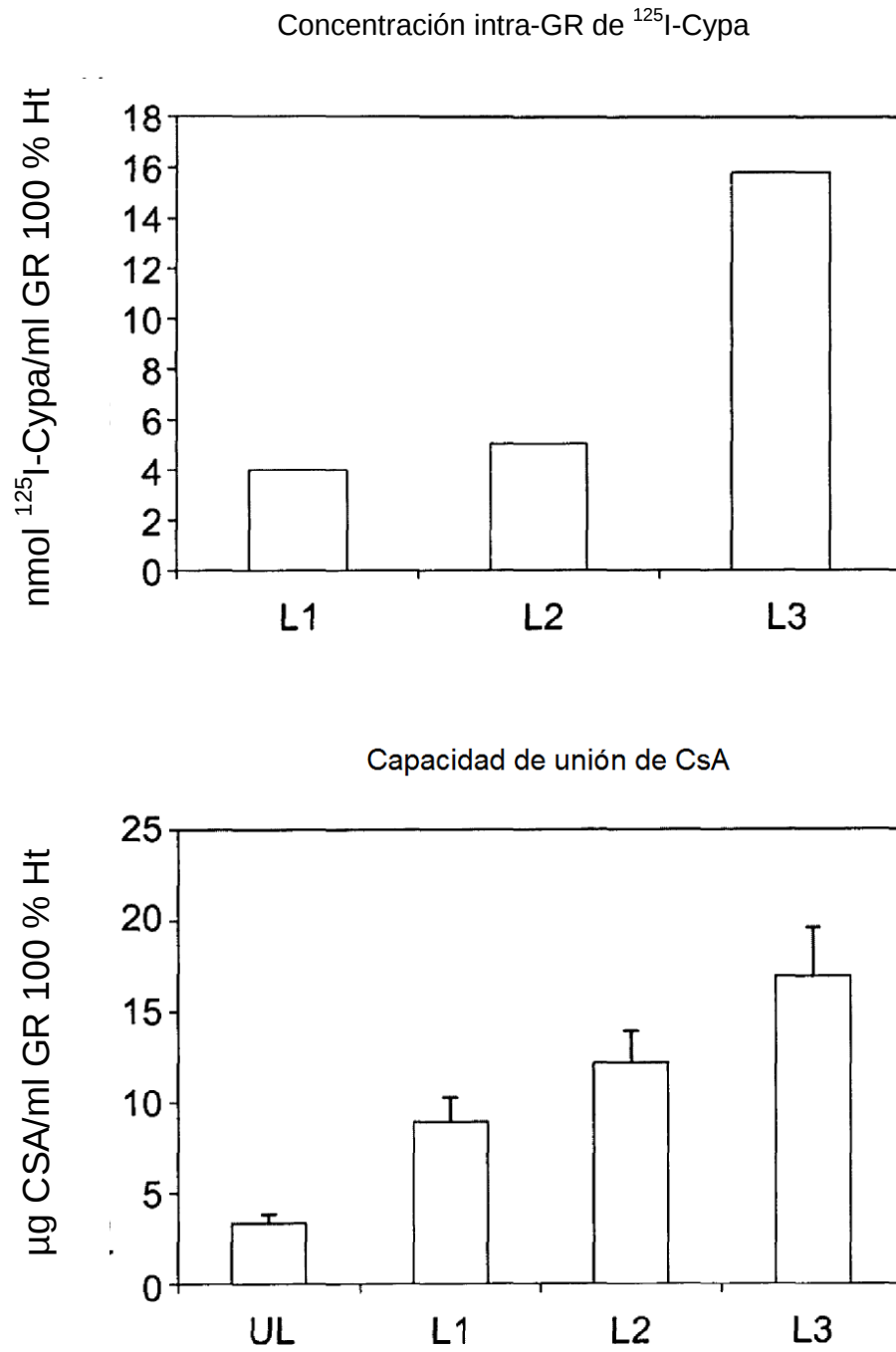


Fig. 11

Concentración intra-eritrocítica de ^{125}I -CypA v capacidad de unión de CSA de GR cargados con CypA