

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 419**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 35/18** (2015.01)  
**A61K 31/661** (2006.01)  
**A61P 9/14** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014 PCT/IB2014/061338**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14181309**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014 E 14732387 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 2994117**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de eritrocitos cargados con una o más sustancias de interés farmacéutico y eritrocitos obtenidos de esta manera**

30 Prioridad:

**10.05.2013 IT RM20130280**  
**05.11.2013 IT RM20130610**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.10.2023**

73 Titular/es:

**ERYDEL S.P.A. (100.0%)**  
**Via Antonio Meucci 3**  
**20091 Bresso MI, IT**

72 Inventor/es:

**MAMBRINI, GIOVANNI;**  
**BENATTI, LUCA;**  
**CAPOGROSSI, GIOVANNI y**  
**MANDOLINI, MARCO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 950 419 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**

Procedimiento para la preparación de eritrocitos cargados con una o más sustancias de interés farmacéutico y eritrocitos obtenidos de esta manera

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar eritrocitos cargados con uno o más ingredientes activos, los eritrocitos cargados obtenidos de esta manera y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos eritrocitos cargados.

10 La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos eritrocitos y la aplicación terapéutica de estos, en particular en el tratamiento de la Ataxia telangiectasia.

Estado de la técnica anterior

15 Los glóbulos rojos, también conocidos como eritrocitos, se incluyen en el estado de la técnica anterior entre los portadores de fármacos que son capaces de transportar y liberar a la circulación y/o dirigir los ingredientes activos de manera eficiente a los sitios diana. La ventaja del uso de eritrocitos como portadores de fármacos radica principalmente en el hecho de que el ingrediente activo puede mantenerse en circulación durante períodos de días o semanas y, de todos modos, durante períodos mucho más largos de lo que normalmente ocurren cuando se usan  
20 formulaciones orales o intravenosas o sistemas de liberación sostenida mediados por liposomas u otros portadores de fármacos. Además, una vez que estos portadores han realizado su función de portar el ingrediente activo, se eliminan de la circulación a través la vía fisiológica de eliminación de los eritrocitos nativos en el hígado y el bazo.

25 Se han propuesto numerosos procedimientos para encapsular ingredientes activos o medios de contraste en glóbulos rojos humanos o de mamíferos con fines biomédicos y clínicos.

En particular, la patente EP0882448 describió por primera vez un procedimiento para encapsular fármacos en eritrocitos en concentraciones suficientes para obtener el efecto farmacológico deseado. El procedimiento descrito en la patente anterior mencionada anteriormente incluye una serie de etapas operativas que pueden resumirse de la  
30 siguiente manera:

- una primera etapa en el que los eritrocitos se hinchan,
- una segunda etapa en el que se lisan los eritrocitos hinchados para permitir la apertura de poros en la membrana de dichos eritrocitos lo suficientemente grandes como para permitir que los ingredientes activos de interés  
35 atraviesen el interior del espacio intracelular,
- una etapa de concentración de los eritrocitos lisados
- una etapa de encapsulación en la que los eritrocitos se ponen en contacto con los ingredientes activos, seguido de un cierre/sellado de los eritrocitos con el propósito de capturar los ingredientes activos en los glóbulos rojos.

40 El procedimiento descrito anteriormente ha permitido obtener eritrocitos cargados con ingredientes activos y adecuados para ser usados como portadores de fármacos. Actualmente, el procedimiento de referencia más eficaz para encapsular fármacos en glóbulos rojos es, para los expertos del sector, el descrito anteriormente.

45 Sin embargo, al usar este procedimiento se ha observado que en la etapa de concentración de los eritrocitos lisados en las condiciones de operación definidos en la patente especificada anteriormente (EP0882448), estos eritrocitos lisados están sujetos a un estrés mecánico que puede dificultar bastante la siguiente etapa de reconstitución de los eritrocitos cargados.

50 Entre las diversas técnicas conocidas para encapsular ingredientes activos en eritrocitos, la descrita en la patente EP1773452-B1 proporciona una corrección de los parámetros del procedimiento, tal como el cambio del régimen de flujo de la solución de lisis y el ajuste de la osmolalidad de esta, con el fin de obtener reproducibilidad en la encapsulación del ingrediente activo a medida que varía la fragilidad osmótica (o resistencia osmótica globular) del paciente.

55 Además, el documento US4327710 se refiere a un procedimiento para la preparación de eritrocitos cargados. ROPARS C Y OTROS, núm. 51, 1 de enero de 1985, páginas 82-91, describe los eritrocitos lisados/resellados como posibles portadores de fármacos para, por ejemplo, desferal (mesilato de deferoxamina). Reena Gill, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 1 de febrero de 2012, páginas 383-397 divulga los procedimientos para cargar eritrocitos con principios activos. SABRINA BUONI Y OTROS, ARCHIVES OF  
60 NEUROLOGY, vol. 63, núm. 10, 1 de octubre de 2006 (2006-10-01), página 1479 informan que la betametasona es útil en el tratamiento de los síntomas neurológicos de la ataxia telangiectasia. En "Dexamethasone sodium phosphate (EryDex) for ataxia telangiectasia - first line", 1 de febrero de 2012, páginas 1-5 se discute el diseño del estudio clínico con eritrocitos cargados con dexametasona en pacientes con ataxia-telangiectasia. El documento WO 2011/135431 divulga un procedimiento para cargar eritrocitos con principios activos con fines terapéuticos y de  
65 diagnóstico

El ámbito de la presente invención es mejorar aún más los resultados ya satisfactorios logrados con el procedimiento descrito en el documento EP 0882448 con el fin de obtener un procedimiento mejorado para encapsular sustancias de interés farmacéutico en eritrocitos.

5 Sumario de la invención

La presente solicitud se refiere a un procedimiento para preparar eritrocitos cargados con una o más sustancias de interés farmacéutico que, en comparación con el mismo procedimiento descrito en el estado de la técnica conocido, parece estar mejorado en varios aspectos.

10 En particular, este procedimiento comprende una serie de etapas operativas, que se caracterizan por el hecho de que la etapa de concentración de los eritrocitos se realiza antes de la etapa de lisis celular, esta última necesaria para permitir que las moléculas farmacéuticamente activas sean encapsuladas en los glóbulos rojos. Más precisamente, esta etapa de lisis se realiza durante la etapa de contacto con una solución que comprende la  
15 sustancia a ser encapsulada.

El procedimiento de la invención que proporciona que los eritrocitos de partida experimenten dos etapas de hinchamiento celular sucesivas, sin lisis, mediante el uso de soluciones hipotónicas apropiadas; de hecho, estas etapas reemplazan la etapa de hinchamiento y la etapa de lisis de acuerdo con el mismo procedimiento de la técnica anterior.

20 Por lo tanto, el objeto de la presente invención es un procedimiento para preparar eritrocitos cargados con una o más sustancias de interés farmacéutico, tales como ingredientes activos, que comprende etapas en las que:

- 25 a). los eritrocitos se hinchan con una primera solución hipotónica,  
b). los eritrocitos obtenidos en la etapa a) se hinchan aún más, sin llegar a la lisis, mediante el uso de una segunda solución hipotónica, que es más hipotónica que dicha primera solución,  
c). los eritrocitos obtenidos en la etapa b) se concentran,  
30 d). los eritrocitos concentrados de esta manera se ponen en contacto con una solución de lisis que comprende una o más sustancias de interés farmacéutico y subsecuentemente  
e). se añade una solución sellante para obtener una población de glóbulos rojos cargada con dichas sustancias de interés farmacéutico.

35 Ventajosamente, el procedimiento puede comprender una etapa intermedia (a2) entre las etapas (a) y (b), en el que la primera solución hipotónica se elimina al menos en parte antes de agregar la segunda solución hipotónica.

Otros objetos de la invención son la población de eritrocitos cargados con uno o más ingredientes activos que pueden obtenerse por medio del procedimiento anterior y las composiciones farmacéuticas que comprenden una población de eritrocitos cargados como se define anteriormente.

40 Otros objetos de la invención son composiciones farmacéuticas que comprenden los eritrocitos cargados con uno o más ingredientes activos obtenidos mediante el procedimiento anterior y dichos eritrocitos y composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, ataxia telangiectasia.

45 La invención en base al descubrimiento sorprendente de que es posible encapsular ingredientes activos en los eritrocitos sometidos únicamente a etapas de hinchamiento y concentración sin inducción previa de hemólisis. En efecto, la apertura de los poros (hemólisis) puede obtenerse de manera eficaz, después de la concentración, con la misma solución que contiene las sustancias de interés. El nuevo procedimiento es mucho más efectivo que los anteriores, y genera un producto final (eritrocitos que contienen al menos una sustancia farmacéuticamente activa) muy similar a los eritrocitos nativos (no sometidos al procedimiento).

50 Ventajas que proporciona la invención

Los cambios operativos introducidos en el nuevo procedimiento permiten tanto preservar mejor la membrana plasmática de los glóbulos rojos como conseguir una mayor concentración, lo que proporciona de esta manera una eficiencia de encapsulación muy superior.

60 En el procedimiento de la presente invención, la encapsulación de las sustancias de interés se realiza con un mejor rendimiento en comparación con el procedimiento descrito en el estado de la técnica conocido, lo que permite la encapsulación de una mayor cantidad de sustancias terapéuticamente activas. En particular, los inventores de este procedimiento han demostrado que, para lograr los mismos niveles de ingrediente activo encapsulado, es posible usar, en el procedimiento de la invención, una cantidad de ingrediente activo inicial significativamente menor a la que se usa actualmente con el procedimiento estándar descrito en el documento EP0882448. En particular, como también se describió en la sección experimental, para encapsular hasta aproximadamente 11 mg, por ejemplo, de fosfato sódico de dexametasona, con la misma cantidad de glóbulos rojos sometidos al tratamiento, se necesitan  
65

aproximadamente 500 mg de fármaco inicial con el procedimiento del estado de la técnica y sólo 62,5 mg con el procedimiento descrito en la presente memoria.

5 Además, este procedimiento ha demostrado ser reproducible y fiable en la encapsulación de cantidades de la sustancia de interés en glóbulos rojos en proporción a la cantidad inicial de dicha sustancia: estas características permiten el uso clínico de diferentes dosis, lo que permite administrar dosis proporcionales a diferentes necesidades clínicas, variando únicamente la cantidad de ingrediente activo añadido durante el procedimiento.

10 La mayor eficiencia de encapsulación se demostró no solo con moléculas activas que tenían pesos moleculares bajos (por ejemplo, fosfato sódico de dexametasona como se muestra en el Ejemplo 1), sino también con moléculas que tenían pesos moleculares altos. Como se informó en el Ejemplo 5, se han encapsulado de manera eficaz proteínas que tenían pesos moleculares en el orden de 110 kDa (dímeros de hexoquinasa de levadura - HK - de 55 kDa) o del orden de 60 kDa (fosforilasa de timidina).

15 Gracias a la secuencia modificada de las etapas operativas, también se han obtenido mejoras significativas en los parámetros fisiológicos relacionados con la población de eritrocitos cargados obtenidos mediante el procedimiento de la invención. En particular, como se muestra en los ejemplos, los eritrocitos cargados mediante el uso del procedimiento descrito en la presente memoria tienen parámetros, tal como el volumen celular medio y la viabilidad celular (metabolismo), totalmente comparables a los de los eritrocitos no tratados. En general, los datos  
20 experimentales muestran que el nuevo procedimiento es capaz de preservar mejor el tamaño celular y el contenido celular de los eritrocitos iniciales en comparación con el estado de la técnica anterior, lo que permite obtener una población de eritrocitos cargados significativamente más similar a una población de eritrocitos no tratados desde una perspectiva fisiológica.

25 Experimentos comparativos realizados sobre la población de eritrocitos cargados de acuerdo con la invención o con el procedimiento análogo del estado de la técnica anterior (el documentoEP0882448) han demostrado, por ejemplo, que el volumen celular medio (MCV) de los glóbulos rojos es de aproximadamente 86 femtolitros (presente invención) y aproximadamente 71 femtolitros (técnica anterior) respectivamente, donde el valor de MCV para eritrocitos no tratados está entre 80 y 97 femtolitros. Además, la cantidad de hemoglobina corpuscular media (MCH)  
30 medida en los glóbulos rojos sometidos al procedimiento en la presente memoria y la descrita en el estado de la técnica anterior resultaron ser de aproximadamente 21,2 picogramos (mucho más cerca de lo normal) y aproximadamente 14 picogramos (técnica anterior) respectivamente, con un valor para eritrocitos no tratados, que normalmente varía entre 27,6 y 33,3.

35 La mejor superposición entre los eritrocitos cargados con este procedimiento y los eritrocitos no tratados también se confirma por el aumento de la viabilidad celular (metabolismo) observado. En particular, como se describió con más detalle más abajo, la viabilidad de los eritrocitos tratados de acuerdo con la presente invención es significativamente mejor en términos tanto de capacidad metabólica aumentada como de presencia reducida de marcadores de senescencia. Como se analiza con más detalle más abajo, los datos relacionados con la mayor viabilidad celular  
40 (mayor metabolismo y menos marcadores de senescencia) nos permiten afirmar que el procedimiento descrito en la presente memoria es, de hecho, capaz de producir una población de eritrocitos cargados que tienen una vida media más larga en comparación con los eritrocitos obtenidos con el procedimiento del estado de la técnica. De ello se deduce que la población de eritrocitos de acuerdo con la invención permite el transporte de las sustancias encapsuladas y/o su liberación durante un período de tiempo superior que el permitido por los eritrocitos cargados  
45 de acuerdo con el procedimiento descrito en el estado de la técnica anterior.

Gracias a las soluciones técnicas descritas, la presente invención también permite superar los límites del procedimiento descrito en el documento EP1773452-B1 y obtener una encapsulación reproducible de la sustancia activa sin corrección de los parámetros del procedimiento para cada paciente individual, ya que el procedimiento es independiente tanto de la diferente fragilidad osmótica de los glóbulos rojos del paciente (como se demuestra en el Ejemplo 7) como del hematocrito inicial (como demostrado en el Ejemplo 8).  
50

Las propiedades ventajosas descritas anteriormente para los eritrocitos de la invención, especialmente la mayor cantidad de medicamento encapsulado dentro de los eritrocitos y su vida media más larga hacen que dichos eritrocitos sean efectivos en el tratamiento de diferentes enfermedades, por ejemplo, ataxia telangiectasia.  
55

#### Descripción de las Figuras

60 Figura 1: La Figura 1 es una representación esquemática del procedimiento descrito en la presente memoria en comparación con el procedimiento de la técnica anterior (documentoEP0882448).

Figura 2: La Figura 2 es un gráfico que muestra la resistencia osmótica globular (RGO) de dos individuos, evaluada mediante la medición de la hemoglobina libre total en base a la osmolalidad. El RGO también se expresa como la osmolalidad a la que se observa un 50% de hemólisis, es decir, un 50% de hemoglobina libre.

65 Figura 3: Representación de un kit adecuado para la ejecución del procedimiento de la invención cuando se usa en conjunto con un dispositivo médico como se describe en el documento BO2010A000255.

Figura 4: el gráfico en la figura muestra los resultados del estudio compasivo en 4 pacientes afectados por ataxia telangiectasia (02-01, 02-02, 02,05, 02,08) tratados con los eritrocitos producidos por ambos procedimientos mostrados en la técnica anterior (documento EP0882448) (Procedimiento ANTIGUO) y el procedimiento de acuerdo con la presente invención (Procedimiento NUEVO).

- 5  
Glosario de la descripción detallada de la invención
- Algunos términos técnicos típicos del campo técnico se explican más abajo.
- 10 Para el propósito de la presente invención, la expresión "hinchamiento de los eritrocitos" significa un aumento del volumen y de la forma esférica de los eritrocitos debido al aumento de la presión interna provocado por la entrada principalmente de agua, sin embargo, sin que se produzcan fenómenos de apertura anormal de los poros en la membrana celular o rotura irreversible de esta. Normalmente, el hinchamiento tal como se entiende en la presente patente no implica un derrame de material celular.
- 15 Para el propósito de la presente invención, y en el campo técnico específico, los términos "lisis" o "hemólisis" o "lisis parcial" significan la apertura reversible de los poros en la membrana celular con el consiguiente paso libre en ambas direcciones de materiales intracelulares y extracelulares. Por lo tanto, la lisis es un fenómeno de permeabilización temporal y reversible y no implica una ruptura completa e irreversible de la membrana celular.
- 20 De ello se deduce que el término "eritrocito lisado" se refiere a un eritrocito cuya membrana plasmática presenta poros que pueden cerrarse nuevamente de tal manera que se restaura la integridad de la membrana celular.
- 25 Para los propósitos de la presente descripción, la expresión "solución de resellado" se refiere a una solución usada que es capaz de cerrar los poros en la membrana plasmática de los eritrocitos principalmente a través de la salida de agua. Esta solución permite encapsular las sustancias de interés farmacéutico dentro de los eritrocitos gracias a la apertura de dichos poros.
- 30 En esta descripción, la expresión "eritrocitos cargados" significa eritrocitos (también denominados glóbulos rojos) que encapsulan cantidades variables de una o más sustancias de interés.
- 35 Para el propósito de la presente invención, la expresión "eritrocitos sellados" se refiere a glóbulos rojos que, a diferencia del eritrocito lisado, presentan una permeabilidad de la membrana plasmática comparable (superpuesta) a la de los glóbulos rojos no tratados.
- 40 Para implementar el procedimiento de la invención, los eritrocitos iniciales pueden obtenerse mediante la recolección y aislamiento de glóbulos rojos de una muestra de sangre de un individuo. La muestra inicial se trata, preferentemente, con un anticoagulante, tal como heparina, para evitar su coagulación.
- Opcionalmente, los eritrocitos, antes de ser sometidos al tratamiento de acuerdo con la invención, pueden aislarse y someterse a uno o más lavados con solución salina para obtener una población de eritrocitos iniciales en la que no existen o son despreciables las concentraciones de contaminantes, tal como plasma, plaquetas, linfocitos, etcétera.
- 45 **Etapas (a):**
- Como se indicó anteriormente, el procedimiento comprende una etapa a) en la que la población de eritrocitos se hincha inicialmente mediante el uso de una primera solución hipotónica.
- 50 En una realización de la invención, la primera solución hipotónica tiene una osmolalidad de entre 230 y 150 mOsm/kg y, por ejemplo, una osmolalidad preferida de 180 mOsm/kg. En cualquier caso, la osmolalidad y el volumen de la primera solución son tales que el contacto con esta primera solución hace que los glóbulos rojos alcancen una osmolalidad en el intervalo de 250 a 200 mOsm/kg. En particular, la primera solución hipotónica puede obtenerse, por ejemplo, al mezclar 5 volúmenes de solución salina y 3 volúmenes de agua destilada estéril. A modo de ejemplo no limitativo, la etapa (a) puede realizarse al mantener los eritrocitos en aproximadamente 300 ml de la primera solución a una concentración (hematocrito) del aproximadamente 3 al 7%, durante un tiempo de aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.
- 55 La etapa a) puede ir seguida opcionalmente de una etapa para eliminar, al menos en parte, la primera solución hipotónica de los eritrocitos hinchados. Tal eliminación puede obtenerse, por ejemplo, mediante centrifugación cuidadosa de los eritrocitos tratados y la separación del sobrenadante.
- 60 **Etapas (b):**
- 65 Los eritrocitos hinchados obtenidos como se describió anteriormente se someten después a un mayor hinchamiento mediante el uso de una segunda solución hipotónica (etapa b). La segunda solución se caracteriza por el hecho de que es más hipotónica que la primera solución. La tonicidad de la segunda solución se elige de tal manera que

provoque un mayor hinchamiento de los eritrocitos, sin embargo, sin provocar la lisis de estos, lo cual resultaría en la consiguiente salida de material intracelular. Las condiciones de hipotonicidad se controlan de tal manera que se evite la inducción de una excesiva fragilidad celular en vista de la siguiente etapa de concentración de los eritrocitos. Los valores de osmolalidad de la segunda solución hipotónica se determinan experimentalmente en el laboratorio y son constantes en el procedimiento. La osmolalidad de la segunda solución es tal que induce un estado de hinchamiento en los glóbulos rojos, pero sin que esto conduzca a la apertura de poros en su superficie, lo que provoca de esta manera la salida inicial del contenido celular y una excesiva fragilidad de los eritrocitos.

La segunda solución hipotónica tiene una osmolalidad en el intervalo de 80 a 170 mOsm/kg. En una realización preferente, la osmolalidad de la segunda solución es aproximadamente 120 mOsm/kg. En cualquier caso, la osmolalidad y el volumen de la segunda solución son tales que el contacto con esta segunda solución hace que los glóbulos rojos alcancen una osmolalidad en el intervalo de 200 a 170 mOsm/kg.

En particular, la segunda solución hipotónica puede obtenerse, por ejemplo, al mezclar 5 volúmenes de solución salina y 7 volúmenes de agua destilada estéril.

A modo de ejemplo, la etapa (b) puede realizarse manteniendo los eritrocitos en aproximadamente 64 ml de la segunda solución a una concentración (hematocrito) de aproximadamente 8 al 15%, durante un tiempo de aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.

Etapa (c):

Los eritrocitos hinchados resultantes de las etapas a) y b) anteriores se someten después a una etapa c) de concentración. Cualquier tecnología conocida adecuada para la concentración de una muestra de eritrocitos, tal como, por ejemplo, hemofiltración, centrifugación o diálisis, puede usarse para concentrar los eritrocitos hinchados. En una realización preferente de la invención, la concentración se realiza por hemofiltración.

En particular, en la hemofiltración, puede usarse cualquier filtro de hemoconcentración (o incluso filtro de dializado), conocido por los expertos en la técnica, para separar la porción celular del líquido en el que está suspendida con el fin de reducir el volumen de suspensión y, por lo tanto, concentrar los eritrocitos hinchados. En general, cuanto menor sea el volumen del filtro de hemoconcentración (por ejemplo, tamaños para uso neonatal o pediátrico), mayor será el nivel de hemoconcentración que puede alcanzarse.

La hemoconcentración se realiza preferentemente a temperatura ambiente durante un tiempo que varía entre 15 y 35 minutos. En general, la concentración de eritrocitos (hematocrito) obtenida al final de la etapa c) es superior al 30 %, por ejemplo 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %. En esta etapa de concentración, la osmolalidad de la suspensión de eritrocitos es casi constante, al variar sólo unas pocas unidades de mOsm/kg en comparación a la osmolalidad obtenida tras el contacto con la segunda solución hipotónica usada en la etapa anterior b).

Dado que la etapa de concentración se realiza sobre glóbulos rojos que están hinchados, pero esencialmente intactos en su estructura, es decir, no lisados, el procedimiento descrito en la presente memoria reduce significativamente el riesgo de obtener eritrocitos dañados de manera irreversible hasta el punto de que ya no puedan usarse de manera efectiva como portadores de fármacos. De hecho, el propósito óptimo del procedimiento es el de obtener una población de eritrocitos cargados y "reconstituidos" con características lo más cercanas posible a las características fisiológicas de la población inicial y aún capaz de desempeñar el papel de portador de manera eficaz y durante largos periodos de tiempo.

Etapa (d):

A continuación, los eritrocitos así concentrados se ponen en contacto con una solución hipotónica de lisis que comprende una o más sustancias de interés farmacéutico (etapa d). La característica de esta solución es que reduce la osmolalidad de los glóbulos rojos hasta el punto de provocar su lisis temporal, es decir, la apertura reversible de los poros en la membrana celular. La solución que contiene los ingredientes activos puede ser, por ejemplo, una solución acuosa con baja osmolalidad.

En una realización preferente de la invención, la solución de lisis tiene una osmolalidad que oscila de 10 a 100 mOsm/kg. En cualquier caso, la osmolalidad y el volumen de la solución de lisis son tales que el contacto con la solución de lisis hace que los glóbulos rojos alcancen una osmolalidad en el intervalo de 150 a 110 mOsm/kg.

Esta solución, además de ser hipotónica, contiene las sustancias de interés a encapsular. La permeabilización de la membrana plasmática de los eritrocitos favorecerá la difusión en el interior de la célula.

A modo de ejemplo, la etapa (d) puede realizarse al mantener los eritrocitos, a una concentración (hematocrito) del 30-65 %, en contacto con la solución de lisis que contiene las sustancias activas, durante un tiempo de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

Etapa (e):

Con el fin de encapsular las moléculas de interés dentro de los eritrocitos, se usa una solución de sellado para restaurar los parámetros de los eritrocitos tratados lo más cerca posible a las condiciones fisiológicas. La solución de sellado es una solución hipertónica con una osmolalidad en el intervalo de 300 a 5.000 mOsm/kg.

En una realización específica de la invención, la solución de sellado que se usó es una solución de Fosfato-Inosina-Glucosa-Piruvato-Adenina (PIGPA). Por tanto, es posible obtener un efecto de cierre similar con cualquier solución hipertónica compuesta, por ejemplo, de agua destilada y minerales u otros nutrientes usados por los glóbulos rojos. Sin embargo, se prefiere la solución hipertónica PIGPA ya que contiene nutrientes que ayudan a la célula a restaurar parte del contenido perdido, así como también funciones metabólicas celulares. En este sentido, se favorece el resellado de los poros y se restaura la estructura normal de la membrana (resellado).

A modo de ejemplo, la solución de sellado tiene preferentemente la siguiente composición:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  33 mM, KCl 1.606 M, NaCl 0,194 M, inosina 0,1 M, adenina 5 mM, ATP 20 mM, glucosa 0,1 M, piruvato 0,1 M y  $\text{MgCl}_2$  4 mM. A modo de ejemplo, pueden usarse aproximadamente 3 ml de la solución de sellado para un volumen de aproximadamente 35 a 55 ml de eritrocitos lisados a una concentración (hematocrito) de aproximadamente 15-40 %. En particular, el contacto de la solución de sellado con los eritrocitos puede realizarse, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos, preferentemente a una temperatura de 37 °C. En esta etapa, la suspensión de glóbulos rojos se lleva a una osmolalidad al menos igual o superior que los niveles fisiológicos. Aunque la temperatura de 37 °C no es esencial, contribuye a la rápida y óptima recuperación de los procedimientos metabólicos dentro de la célula.

Las sustancias de interés farmacéutico a encapsular, solas o en combinación, en los glóbulos rojos pueden seleccionarse de aquellas conocidas de acuerdo con las necesidades de tratamiento específicas requeridas.

En una realización de la invención, los compuestos de interés farmacéutico se eligen entre los siguientes grupos: ingredientes activos seleccionados de péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas; corticoesteroides, glucocorticoides, agentes antirretrovirales antiinflamatorios,

Por ejemplo, las sustancias pueden seleccionarse entre prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, betametasona, fosfato sódico de betametasona, fosforilasa de timidina, fenilalanina amonio liasa. Las sustancias activas preferidas son dexametasona y beta dexametasona, también en forma de fosfato y deflazacort, mientras que la sustancia activa con mayor preferencia es el fosfato sódico de dexametasona. En una realización de la presente invención, los ingredientes activos también pueden incluir profármacos, en particular, precursores de ingredientes bioactivos. A modo de ejemplo no limitativo, este profármaco puede ser el fosfato sódico de dexametasona (o dexametasona 21-fosfato), el cual, una vez encapsulado en el glóbulo rojo y administrado al paciente, se convierte, a través de un mecanismo de activación endógena (desfosforilación), en el fármaco antiinflamatorio activo llamado dexametasona. Alternativamente, la conversión de profármaco a fármaco puede obtenerse mediante la coadministración del activador adecuado en el mismo eritrocito, en caso de que no exista un mecanismo de activación endógena.

Otro objeto de la presente invención es una población de eritrocitos cargados con una o más sustancias de interés farmacéutico que pueden obtenerse mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Como ya se indicó, la población de eritrocitos obtenida con el procedimiento de la presente invención muestra una mayor viabilidad celular (metabolismo y supervivencia) en comparación con la misma población obtenida con el procedimiento descrito en la literatura. En particular, los eritrocitos tratados de acuerdo con la presente invención tienen una vida media celular, evaluada en términos de porcentaje de fosfatidilserina medida con el ensayo de anexina V, muy similar a la de los eritrocitos nativos. El ensayo de anexina V se realiza en la práctica de laboratorio por el técnico de laboratorio y ya se ha descrito en la literatura (Canónico B. y otros, 2010). Por lo tanto, no se proporcionan más detalles en la presente descripción. Dicho ensayo mide el porcentaje de eritrocitos que expresan fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana plasmática cuya presencia es indicativa de daño y envejecimiento celular acelerado a través del mecanismo de eliminación natural. En general, los glóbulos rojos con fosfatidilserina expuesta están sujetos a fagocitosis y se eliminan del torrente sanguíneo más rápidamente que los eritrocitos que no tienen esta proteína en la membrana externa. Por consiguiente, se deduce que cuanto menor sea el porcentaje de eritrocitos con exposición a fosfatidilserina, mayor será previsiblemente la vida media de los eritrocitos puestos en circulación en el cuerpo humano. El aumento de la vida media se refleja en el mayor tiempo de liberación del medicamento o en el mayor tiempo de transporte en el torrente sanguíneo. En la población de eritrocitos cargada con el procedimiento de la invención se observan porcentajes medios de exposición a fosfatidilserina inferiores al 10 %, por ejemplo, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, mientras que el valor correspondiente de exposición a fosfatidilserina en eritrocitos tratados con otros procedimientos puede superar al 20-40 %. Estos resultados demuestran que el procedimiento de la invención permite obtener eritrocitos portadores, los cuales, tienen una vida media predecible casi natural, transportan en el torrente sanguíneo y/o liberan las sustancias encapsuladas por un período de tiempo suficientemente largo para cumplir con las necesidades farmacológicas más comunes.

5 La excelente viabilidad de la población de eritrocitos descrita en la presente memoria también se confirma mediante la evaluación de la capacidad metabólica de los eritrocitos obtenidos. La evaluación de la capacidad metabólica, como es sabido por los expertos del sector, es indicativa de la capacidad de una célula para preservar las funciones bioquímicas necesarias para su supervivencia. Los glóbulos rojos son células cuya producción de energía se basa esencialmente en la vía bioquímica de la glucólisis en la que el lactato es el producto final. Se ha demostrado para la población de eritrocitos que constituye el objeto de la presente solicitud que la cantidad media de lactato producido por cada  $10^6$  eritrocitos es superior a 0,100 nmol/h, es decir, muy similar a la de los eritrocitos nativos.

10 Las características bioquímicas/moleculares descritas anteriormente, relativas a la población de eritrocitos que constituye el objeto de la presente solicitud, indican que esta población puede usarse más eficientemente como un portador de ingredientes activos que la población de eritrocitos descrita en el estado de la técnica anterior, ya que se caracteriza por una mayor viabilidad y una vida media previsiblemente más larga.

15 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende eritrocitos cargados obtenidos de acuerdo con la invención y un excipiente farmacológicamente aceptable.

20 Las composiciones descritas en la presente memoria son composiciones adecuadas para la administración de eritrocitos y apropiadas para alcanzar el sitio diana de interés farmacológico. Por tanto, estas son composiciones para administración parenteral preferentemente en una solución fisiológica, pero también, por ejemplo, suspensiones acuosas (incluida la glucosa) o aquellas formuladas como se describió en la técnica anterior. A modo de ejemplo no limitativo, pueden usarse agua o tampones, integrados con preservantes, estabilizadores, azúcares y minerales, etcétera, como excipientes farmacológicamente aceptables. Tales composiciones también pueden estar en forma liofilizada para su almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes de su uso.

25 El procedimiento de la presente solicitud puede realizarse con cualquier aparato conocido adecuado para hemofiltración con manejo de diferentes soluciones y control de flujos, osmolalidad y volúmenes. Preferentemente, el aparato y el procedimiento funcionan automáticamente en base a un programa adecuado, por ejemplo, mediante el uso de un aparato eléctrico médico denominado Cargador de glóbulos rojos.

30 Un ejemplo del kit para realizar el procedimiento de acuerdo con la reivindicación, para usarse en conjunto con el equipo descrito en la Solicitud de patente italiana BO2010A000255 anterior, se muestra en la Figura 3. El kit contiene los siguientes elementos estructurales numerados:

- 35 (1) Conector de espiga para solución hipotónica 1
- (2) Conector de espiga para solución hipotónica 2
- (3) Conector de espiga para bolsa de 2 litros de solución salina inyectable (lavado)
- (4) Conector para bolsa de desecho
- (5) Conector Luer para la entrada de 50 ml de sangre del paciente (jeringa de 50 ml)
- 40 (6) Bolsa de recolección final
- (7) Bolsa de desecho
- (8) Bolsa de transferencia
- (9) Conector de la bomba al Cargador de Glóbulos Rojos (lado derecho de la máquina, lado del poste de soporte)
- 45 (10) Depósito (para ultrafiltrado)
- (11) Filtro de hemoconcentración
- (12) Tazón (tazón Latham para separación y lavado de sangre)
- (13) Punto perforable (para entrada del fármaco y solución de sellado PIGPA).

50 Cualquier tipo de enfermedad que necesite un tratamiento mediante un medicamento encapsulable adecuado del ingrediente activo puede tratarse ventajosamente con los eritrocitos de la invención. Un ejemplo de dichas enfermedades es la ataxia telangiectasia (AT) tratada con dexametasona, preferentemente fosfato sódico de dexametasona.

55 La AT es una patología genética rara, autosómica recesiva, causada por la mutación del gen ATM con una incidencia de 1:40.000 / 1:300.000. La AT provoca una neurodegeneración progresiva del cerebelo que causa una ataxia progresiva (desorganización motora). Puede definirse alrededor de los 2 años de vida y su degeneración es bastante rápida, lo que conduce normalmente al encierro en silla de ruedas alrededor de la segunda década de vida. Los principales síntomas neurológicos son disartria cerebelosa, dismetría y falta de coordinación de los movimientos oculares a los que pueden sumarse síntomas extrapiramidales tales como corea o bradicinesia. Los pacientes son muy susceptibles a la infección y normalmente mueren después de 20 años debido a complicaciones pulmonares graves o aparición de leucemia.

### Ejemplos

65 Más abajo se describe la invención con todos los detalles experimentales en los siguientes ejemplos, los cuales son puramente descriptivos y no limitativos de la presente invención.



Ejemplo 1: Procedimiento de carga de eritrocitos

El procedimiento de carga de eritrocitos se realizó mediante el uso del aparato descrito en la solicitud de patente (IT) BO2010A 000255 y U.S. 61/373,018 como se detalla más abajo.

5 Los eritrocitos, separados de 50 ml de sangre total por medio de un sistema centrífugo del tipo "Latham Bowl" girando a 5.600 rpm, se lavan con 750 ml de solución salina a una velocidad de lavado de 225 ml/min y se transfieren a la bolsa de transferencia.

10 Se añade a la bolsa de transferencia una cantidad de 300 ml de una primera solución hipotónica con una osmolalidad de 200 mOsm/kg, que después se incuba en una placa de agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, la primera solución hipotónica se elimina mediante centrifugación (Bowl) hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 80 ml.

15 Los eritrocitos concentrados de esta manera se vuelven a transferir a la bolsa de transferencia a la que se añaden 64 ml de una segunda solución hipotónica con una osmolalidad de 180 mOsm/kg.

A continuación, la bolsa se incuba a temperatura ambiente en una placa en agitación durante 5 minutos. Después de la incubación, los eritrocitos se concentran mediante el uso de un filtro de hemoconcentración y se recolectan aproximadamente 80 ml de ultrafiltrado en el depósito al que se aplica una ligera presión negativa por medio de una bomba de vacío. Los eritrocitos concentrados de esta manera se recuperan y transfieren a una bolsa de transferencia. El fármaco de interés, en este ejemplo fosfato sódico de dexametasona (25 mg/ml), se mezcló previamente con aproximadamente 11 ml de agua para soluciones inyectables (la preparación tiene una osmolalidad de aproximadamente 20 mOsm/kg) y se añadió a los eritrocitos concentrados mediante inyección en la bolsa de transferencia. Esta operación debe realizarse en 5 minutos. A continuación, el contenido de la bolsa de transferencia se incuba a temperatura ambiente en una placa en agitación durante 10 minutos. Después se añade una cantidad de 3 ml de una solución de sellado (con una osmolalidad de 3.800 mOsm/kg). Esta adición debe realizarse en 5 minutos. La bolsa de transferencia se incuba durante 30 minutos a 37 °C ± 2 en la placa de agitación. Después, los eritrocitos se transfieren al recipiente y se lavan a fondo con 1.100 ml de solución salina a una velocidad de flujo de 225 ml/min. Finalmente, los eritrocitos cargados obtenidos de esta manera se transfieren a una bolsa de recolección final. El tiempo total del procedimiento es aproximadamente 1 h y 30 min.

Ejemplo 2: Eficacia de encapsulación

35 El procedimiento descrito en la presente invención proporciona una eficacia de encapsulación (introducción) del ingrediente activo (en este ejemplo, fosfato sódico de dexametasona) casi 10 veces mayor que el procedimiento conocido (procedimiento 1), como se muestra en la Tabla 1.

40 En particular, se usó como material inicial 50 ml de sangre completa. Durante la fase de carga del ingrediente activo (etapa d) del procedimiento descrito anteriormente, se añaden 20 ml de DSP (fosfato sódico de dexametasona) 25 mg/mL por el procedimiento conocido (es decir, de acuerdo con el documento EP0882448) y solo 2,5 ml de la misma solución de DSP adicionada con 11 ml de agua para inyección en el procedimiento de la presente invención (procedimiento 2).

45 El análisis del contenido de DSP en los eritrocitos cargados de acuerdo con el procedimiento 1 o 2 se realizó mediante el uso de un equipo de HPLC tras la extracción del ingrediente activo del interior de los glóbulos rojos mediante ebullición y dilución en agua y metanol. Los resultados se informan en la Tabla 1.

Tabla 1

		Procedimiento conocido dosis inicial de 500 mg de DSP	Procedimiento objeto de la presente memoria descriptiva dosis inicial de 62,5 mg de DSP
50	DSP encapsulado al final del procedimiento (media)	8,9	11,2
55	mg /bolsa		

Ejemplo 3: Producción de lactato en eritrocitos

60 Se usó una bolsa de sangre completa de un donante sano. Se usó una porción inicial de los glóbulos rojos del donante como muestra no tratada. Se procesó una cantidad de 50 ml de sangre completa mediante el uso del procedimiento de la presente invención. Al final del procedimiento, se recolectaron 30 ml de eritrocitos tratados y se llevaron al 40 % de hematocrito mediante centrifugación. A continuación, se añadió glucosa a cada muestra y estas se incubaron a 37°C durante 3 horas, se analizó la acumulación de lactato en el sobrenadante (transformación de glucosa en lactato mediante la vía glucolítica) cada 30 minutos. El análisis se realizó mediante el uso de un analizador de gases en sangre.

5 La producción de lactato de los RBC (glóbulos rojos) no tratados es comparable a la producción de lactato de los RBC obtenidos con el procedimiento descrito en la presente memoria. Este resultado indica que los glóbulos rojos obtenidos mediante el procedimiento objeto de la presente invención son capaces de mantener su función metabólica principal (glucólisis) transformando la glucosa en lactato con una eficacia similar a la de los glóbulos rojos no tratados (control), como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

	RBC no tratados	Procedimiento descrito en la presente memoria
10 Producción de lactato nmol 10 <sup>6</sup> RBC/h	0,138	Cantidad inicial 250 mg de DSP 0,130

Ejemplo 4: Vida media de los eritrocitos cargados

15 La vida media estimada de los eritrocitos cargados de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente memoria se evaluó mediante la medición de la anexina V en la superficie celular, conocida por ser un marcador de muerte celular (senescencia), como se detalla más abajo.

20 En particular, se usó una bolsa de sangre completa de un donante sano. Se usó una porción inicial de los glóbulos rojos del donante como muestra no tratada. Se procesó una cantidad de 50 ml de sangre completa mediante el uso del procedimiento de la presente invención. Se extrajo una cantidad de 10<sup>9</sup> de eritrocitos del producto final del procedimiento y de la muestra no tratada; se diluyeron en un tampón de reacción para anexina V, se añadieron 3 µl de anexina V conjugada con fluorocromo FITC y se realizó el análisis mediante citometría de flujo.

25 Como se muestra en la Tabla 3 más abajo, el aumento de la anexina V del 0,75 % en el control no tratado al 6,26 % de los glóbulos rojos obtenidos con el procedimiento descrito en la presente memoria es indicativo de que estos últimos todavía tienen una alta capacidad de permanecer en circulación durante mucho tiempo. Para productos en base a glóbulos rojos con fines transfusionales, la literatura reporta valores de anexina V similares a los obtenidos para los glóbulos rojos cargados obtenidos con el procedimiento descrito en la presente memoria (Relevy H. y otros, 2008).

Tabla 3

RBC no tratados	Procedimiento descrito en la presente memoria	250 mg de cantidad inicial de DSP
35 Anexina V %	0,75	6,26

Ejemplo 5: Variación de la dosis encapsulada

40 El procedimiento de la presente invención permite la encapsulación de dosis del ingrediente activo, tal como DSP (fosfato sódico de dexametasona), en un intervalo terapéutico muy amplio simplemente al variar la dosis inicial del fármaco usado, como se muestra en la Tabla 4 más abajo. En particular, se usaron 50 ml de sangre completa para cada experimento y para cada cantidad inicial de DSP. Se añadió una cantidad de 20 ml de DSP 25 mg/mL para la carga del DSP de acuerdo con el procedimiento conocido (documento EP0882448).

45 En el caso del procedimiento descrito en la presente memoria, se adicionaron 10 ml, 5 ml, 2,5 ml y 2 ml de DPS 25 mg/mL, premezclados cada uno en 11 ml de agua para inyección, para las dosis de 250, 125, 62,5 y 50, respectivamente. El análisis del DSP encapsulado en glóbulos rojos requiere primero una dilución 1:10 en agua destilada, una etapa de ebullición de la muestra para desnaturalizar las proteínas, seguido de centrifugación y extracción en agua y metanol. El análisis del DSP encapsulado se realizó mediante HPLC. Los resultados se informan en la Tabla 4.

Tabla 4

		Procedimiento conocido	Procedimiento descrito en la presente memoria			
55 Cantidad inicial de DSP	mg	500	250	125	62,5	50
Dosis encapsulada de DSP	mg	8,9	29,4	18,3	11,2	9,9

60 Ejemplo 6 Encapsulación de ingredientes activos de alto peso molecular

El procedimiento de la presente descripción también permite la encapsulación de proteínas de alto peso molecular tal como la Hexoquinasa (HK) con una eficacia de encapsulación del producto inicial mayor al 15 %, como se muestra en la Tabla 5 más abajo.

65

En particular, se usaron 50 ml de sangre completa de donantes sanos que fueron sometidos al procedimiento de encapsulación descrito en la presente memoria. El ingrediente activo encapsulado fue la proteína Hexoquinasa. En la etapa de adición del ingrediente activo se añadieron 200 mg de HK disueltos en 14 ml de agua para inyección.

5

Tabla 5

		Procedimiento descrito en la presente memoria
Cantidad inicial de proteína HK	UI/total	10.000
Hexoquinasa (HK) encapsulada al final de	UI/total	1.600

10

Ejemplo 7: Influencia de la resistencia osmótica globular al cargamento de eritrocitos.

Cada individuo tiene su propia resistencia osmótica globular (RGO) que puede afectar el resultado del procedimiento de carga. Los datos que se presentan más abajo indican que los donantes con diferentes fuerzas osmóticas mantienen cargas de fármaco muy similares. Por lo tanto, se ha demostrado que el procedimiento de la presente invención no se ve afectado significativamente por el RGO inicial del paciente, como se ilustra en los datos de la Tabla 6, a diferencia de lo que se indica para procedimientos conocidos similares.

Para determinar la variabilidad de la carga del producto dentro de los glóbulos rojos en base a la RGO de diferentes individuos, se usó el procedimiento descrito en la presente invención con una dosis inicial de DSP (fosfato sódico de dexametasona) igual a 50 mg. Se realizaron un total de 5 pruebas a partir de 50 ml de sangre completa de 5 individuos diferentes con diferentes RGO.

La resistencia osmótica globular de cada individuo se midió mediante la dilución de una porción de su sangre completa en soluciones con una concentración decreciente de NaCl (8 valores diferentes de osmolalidad), mediante la medición de la hemoglobina libre en cada una de las soluciones y se construyó la gráfica de hemoglobina libre total en función de la osmolalidad (véase la Figura 1). Después se obtuvo el valor de RGO (correspondiente a la osmolalidad al 50 % de hemólisis o al 50 % de hemoglobina libre) mediante la interpolación de dichas curvas obtenidas. La hemoglobina liberada se cuantificó mediante el reactivo de Drabkin con lectura de espectrofotómetro (Drabkin DL. Med Sci 1949). El análisis de la DSP (fosfato sódico de dexametasona) cargada en los eritrocitos finales se realizó después de la lisis de estos mediante ebullición, extracción en agua-metanol y HPLC. Los resultados se informan en la Tabla 6.

35

Tabla 6

	RGO (Hemólisis mOsm/kg)	RGO (Hemólisis 50 %) Concentración de NaCl	Carga de DSP mg/bolsa
Muestra			
1	153	0,47	9,6
2	143	0,44	10,5
3	151	0,47	9,8
4	141	0,43	10,2
5	143	0,44	9,9
medio	146 ± 5	0,45 ± 0,02	10,0 ± 0,4

Como se muestra en la Tabla 6 anterior, en el procedimiento descrito en la presente memoria, la carga de fosfato sódico de dexametasona (DSP) en glóbulos rojos de individuos con diferentes RGO iniciales (de 141 a 153 mOsm/kg) no mostró cambios tales que permita suponer que existe un efecto farmacológicamente diferente (carga promedio de 10,0 ± 0,4 mg/bolsa). La variación del DSP encapsulado en comparación con la variación del RGO de un individuo como se describió en estos ejemplos es insignificante desde el punto de vista farmacológico.

Ejemplo 8: Influencia de la variación del hematocrito inicial sobre la carga de eritrocitos.

Para determinar la variabilidad de carga de los glóbulos rojos en base al hematocrito de la sangre inicial, se usó el procedimiento descrito en la presente invención con una dosis inicial de DSP (fosfato sódico de dexametasona) igual a 62,5 mg.

Se realizaron un total de 10 pruebas con 5 individuos diferentes (1 prueba de hematocrito con aproximadamente 40 % de hematocrito y 1 prueba con aproximadamente 50 % de hematocrito para cada donante). La estandarización del hematocrito para cada donante se realizó mediante centrifugación o dilución de la sangre inicial. El análisis de la DSP cargada en los eritrocitos finales se realizó tras lisis de estos mediante ebullición, extracción en agua-metanol y HPLC. Los resultados se informan en la Tabla 7.

65

Tabla 7

Muestra	HCT en sangre inicial ajustado al 40 %		HCT en sangre inicial ajustado al 50 %	
	HCT (%)	DSP cargado (mg/bolsa final)	(%)	DSP cargado (mg/bolsa final)
1	39,9	11,48	49,9	13,04
2	40,0	11,72	50,1	10,76
3	39,3	10,94	50,0	10,52
4	40,8	11,75	50,0	11,70
5	40,0	11,16	50,1	9,92
promedio	40,0 ± 0,5	11,41 ± 0,65	50,0 ± 0,1	11,19 ± 1,22

Como muestran los datos informados en la Tabla 7, la carga de fosfato sódico de dexametasona en glóbulos rojos de individuos con diferentes valores iniciales de hematocrito (hematocrito del 40 % al 50 %) es extremadamente constante (de 11,41 a 11,19 mg/bolsa final) y no muestra variaciones estadísticamente significativas ( $p > 0,05$  con prueba t-Student para datos apareados) sin necesidad de variar los parámetros del procedimiento descrito en la presente memoria. La variación del DSP encapsulado en comparación con una variación del 10 % del hematocrito inicial, que por el contrario es una variación altamente significativa ( $p < 0,001$  en la prueba t-Student para datos apareados) de los individuos descritos en estos ejemplos, es despreciable desde el punto de vista farmacológico.

Ejemplo 9: Tratamiento de AT con los eritrocitos de la técnica anterior y de la invención:

#### Estudio Clínico IEDAT -01

Se realizó un Estudio Clínico denominado IEDAT -01 (o IEDAT), en dos centros universitarios italianos Brescia - Roma - Hospital Civil y Universidad La Sapienza. Los pacientes con Ataxia-Telangiectasia incluidos en el estudio fueron tratados con fosfato sódico de dexametasona encapsulado en eritrocitos producidos de acuerdo con la tecnología anterior de acuerdo con el documento EP0882448 (Procedimiento antiguo). Se trata de un estudio prospectivo, abierto, de un periodo de 6 meses. Los pacientes recibieron la terapia EryDex, es decir, fosfato sódico de dexametasona encapsulado en eritrocitos de los propios pacientes, a intervalos mensuales.

Se inscribieron un total de 22 pacientes entre 4 y 19 años de edad, de los cuales 18 completaron regularmente el tratamiento previsto durante 6 meses. El criterio de valoración principal de eficacia del estudio se midió mediante la escala de calificación ICARS ("International Cooperative Ataxia Rating Scale"), que evalúa los cambios en los síntomas neurológicos, al comparar los valores obtenidos al final del periodo de tratamiento de 6 meses con respecto a los valores obtenidos ICARS antes de iniciar el tratamiento (basal). Los resultados para el criterio de valoración primario ( $p = 0,02$ ) y aquellos de los criterios de valoración secundarios del estudio fueron estadísticamente significativos. Esto es tanto en el análisis de la población por Intención de Tratar (ITT), que incluye a los 22 pacientes que ingresaron en el estudio incluso si no lo terminaron, como en el análisis Por Protocolo (PP), que en cambio considera solo a los pacientes que completaron los 6 meses de tratamiento.

Desde el punto de vista de la seguridad, se encontró que el tratamiento es bien tolerado por los pacientes incluidos en el estudio.

#### ICARS

La escala ICARS ("International Ataxia Rating Scale"), desarrollada por Trouillas en 1997, es la herramienta más frecuentemente usada por los neurólogos para evaluar y estandarizar las manifestaciones neurológicas más comunes de los síndromes relacionados con la disfunción cerebelosa (cerebelo), como la Ataxia. El ICARS se usó como medida de resultado en varios ensayos clínicos de intervención, especialmente en la ataxia de Friedrich. Es una escala semicuantitativa dividida en 4 subescalas relacionadas con los siguientes dominios: postura anormal y marcha anormal; funciones cinéticas; trastornos oculomotores y trastornos del lenguaje. La puntuación total máxima es de 100 puntos (0 corresponde a los sujetos sanos, 100 al peor grado de estado del paciente).

IEDAT, estudio compasivo y mejoras neurológicas con el antiguo y nuevo procedimiento

El estudio IEDAT se realizó en 22 pacientes AT y su objetivo era medir el efecto del tratamiento con EryDex (Fosfato sódico de dexametasona encapsulado en glóbulos rojos autólogos de acuerdo con el procedimiento conocido) sobre el estado neurológico de los pacientes a través de la escala ICARS.

4 pacientes que participaron en el estudio IEDAT continuaron el tratamiento con EryDex después de la finalización del estudio en un protocolo clínico denominado "Uso Compasivo".

5 Durante el estudio IEDAT se usaron eritrocitos cargados con fosfato de dexametasona mediante el procedimiento (procedimientos EryDex ANTIGUO, como se describió en la patente EP0882448). Los 4 pacientes que ingresaron en uso compasivo continuaron el tratamiento con EryDex mediante el uso de los procedimientos ANTIGUOS y a continuación pasaron (después de un promedio de 5 tratamientos) al tratamiento con EryDex obtenido mediante el procedimiento descrito de acuerdo con la presente solicitud (EryDex, Procedimientos NUEVOS). Este procedimiento conduce a mejoras significativas en comparación con el procedimiento anterior.

10 La Tabla 8 más abajo muestra que el tratamiento de 4 pacientes AT con los procedimientos ANTIGUOS resultó en una mejora de 3,25 puntos en la escala ICARS después de 5 meses de tratamiento continuo con uso compasivo en comparación con la línea de base del estudio ICARS. Este valor que corresponde a un porcentaje de mejora del 5,9 % se considerarse modesto desde el punto de vista clínico. Una mejora de la escala ICARS menor al 10 % se considera, generalmente, insignificante por los neurólogos.

15 Los beneficios observados en 4 pacientes después del cambio al tratamiento con EryDex obtenido con el nuevo procedimiento son particularmente evidentes. La mejora promedio fue de 6,75 puntos ICARS (13,1 %) en comparación con el valor de ICARS observado después del tratamiento con los procedimientos ANTIGUOS. Los NUEVOS Procedimientos, gracias a la mejora de determinadas características de los glóbulos rojos (más similares a los glóbulos rojos del paciente) y una mejor reproducibilidad de la encapsulación del fármaco, han permitido obtener una mejora neurológica de alta relevancia desde un punto de vista clínico. Un total de 4 pacientes tratados con EryDex, desde el comienzo del estudio IEDAT hasta el final del Estudio Compasivo, tuvieron una mejora promedio de los valores ICARS de 10 puntos, o 18,3 % (última columna de la tabla más abajo). Estos datos son aún más importantes cuando se compara con lo observado en pacientes AT que durante el período de exploración no recibieron el tratamiento con EryDex y que, en promedio, presentaron un empeoramiento de 7 puntos en la escala ICARS.

25

Tabla 8

PACIENTE	Procedimiento ANTIGUO					Procedimiento NUEVO				
	Valores ICARS - ESTUDIO IEDAT					Valores ICARS - USO COMPASIVO				
	Valor basal	Última visita	Valor Basal Delta - Última visita	Final del Tratamiento Procedimiento ANTIGUO	Valor Basal Delta - Procedimiento ANTIGUO	Final del Tratamiento Procedimiento Nuevo	Final Delta del Procedimiento ANTIGUO - Final Nuevo Procedimiento	Valor Basal Delta - Final Nuevo Procedimiento		
02-01	57	53	-4	47	-10	45	-2	-12		
02-02	55	58	3	58	3	53	-5	-2		
02-05	58	56	-2	54	-4	41	-13	-17		
02-08	49	42	-7	47	-2	40	-7	-9		
MEDIO	54,75	52,25	-2,5	51,5	-3,25	44,75	-6,75	-10		
% de mejora ICARS			4,6		5,9		13,1	18,3		

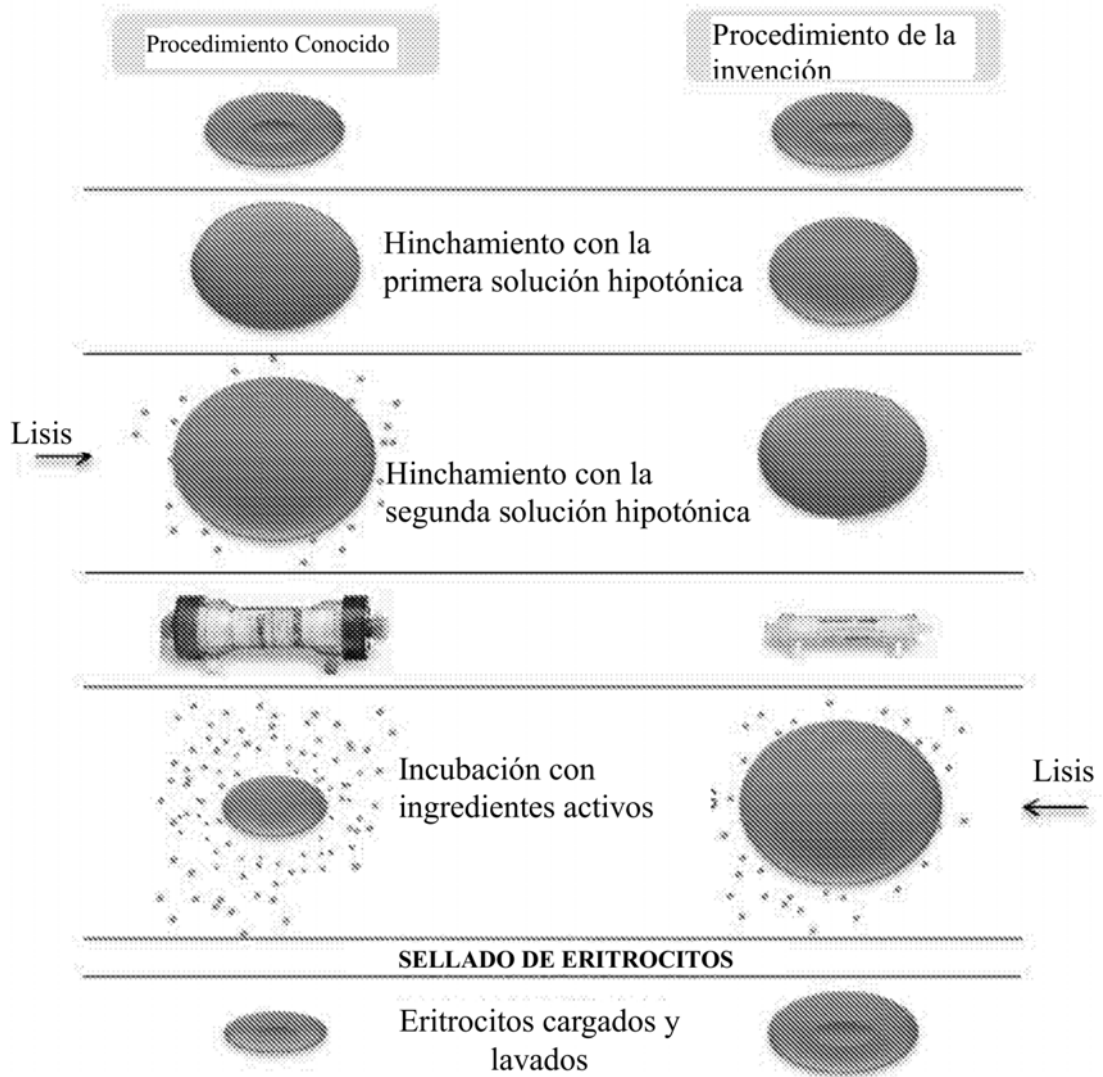
El gráfico de la Figura 4 muestra los valores ICARS de 4 pacientes en los extremos del período de tratamiento con los Procedimientos ANTIGUO y NUEVO (en continuidad entre sí). Las pendientes de las líneas rectas de interpolación en relación a 3 de los 4 pacientes (Pacientes 02-02, 02-05, 02-08) son evidentemente mayores durante el período de tratamiento con los Procedimientos NUEVOS. La pendiente mayor indica claramente que en el período de uso de los procedimientos NUEVOS el paciente mejora su estado neurológico más rápido que en el período de tratamiento con los procedimientos ANTIGUOS (mientras que un caso un paciente, el 02-02, presenta incluso un empeoramiento). Solo en un paciente (02-01) la mejoría tiene una menor velocidad al usar los procedimientos NUEVOS; sin embargo, este paciente ya había logrado una mejoría muy significativa con el tratamiento anterior y, sin embargo, ha mejorado aún más su estado neurológico con los procedimientos NUEVOS.

La mejora progresiva en el estado neurológico, incluso en pacientes que respondieron poco o nada al tratamiento con EryDex obtenido con los procedimientos ANTIGUOS, asociado con un alto nivel de tolerabilidad del tratamiento, demuestra los importantes beneficios clínicos que obtuvo la terapia con EryDex de acuerdo con el procedimiento nuevo y de acuerdo con la presente invención, trae a los pacientes que sufren de ataxia telangiectasia.

**REIVINDICACIONES**

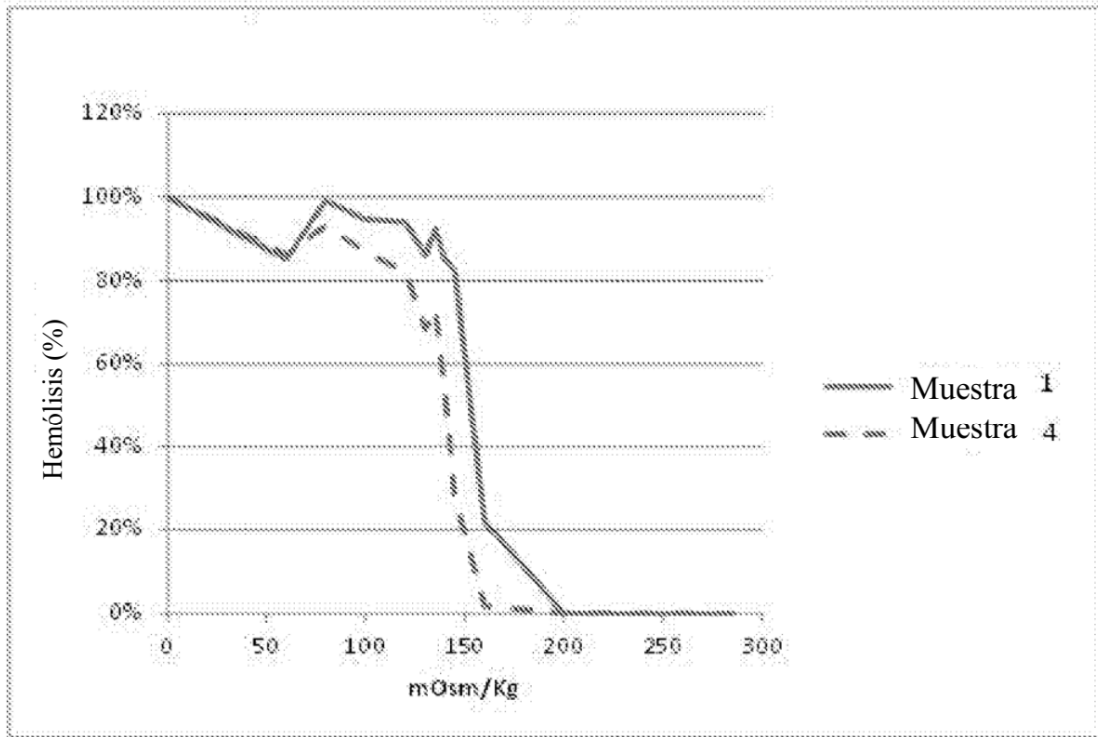
- 5
1. Un procedimiento para preparar eritrocitos cargados con uno o más ingredientes activos que comprende las siguientes etapas:
- 10
- a) hinchar los eritrocitos mediante el uso de una primera solución hipotónica, en la que dicha primera solución lleva los eritrocitos a una osmolalidad entre 250-200 mOsm/Kg;
- b) hinchar aún más los eritrocitos obtenidos en la etapa a), sin llegar a la lisis, mediante el uso de una segunda solución hipotónica más hipotónica que la primera solución hipotónica, en la que dicha segunda solución hipotónica lleva los eritrocitos a una osmolalidad entre 200 y 170 mOsm/Kg;
- 15
- c) concentrar los eritrocitos obtenidos en la etapa b);
- d) poner en contacto los eritrocitos concentrados con una solución de lisis que comprende una o más sustancias de interés farmacéutico, y subsecuentemente
- e) añadir una solución de sellado con el fin de obtener una población de eritrocitos cargada con dicho uno o más principios activos.
- 20
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, entre las etapas (a) y (b), una etapa adicional en la que al menos parte de la primera solución hipotónica se elimina antes de la adición de la segunda solución hipotónica.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha etapa de concentración (c) se realiza mediante hemofiltración, hemodiálisis o centrifugación.
- 25
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la solución de lisis en la etapa (d) lleva los eritrocitos a una osmolalidad entre 150 y 110 mOsm/Kg.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución de sellado en la etapa (e) es una solución hipertónica de 300 a 5.000 mOsm/kg.
- 30
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las sustancias de interés farmacéutico se eligen de los siguientes principios activos: péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, corticoesteroides, glucocorticoides, fármacos antirretrovirales y antiinflamatorios.
- 35
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos principios activos son prednisolona, fosfato de prednisolona, dexametasona, fosfato de dexametasona, betametasona, fosfato de betametasona, deflazacort, fosforilasa de timidina, fenilalanina amonio liasa
- 40
8. Eritrocitos cargados con una o más sustancias de interés farmacéutico obtenibles mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizados porque el porcentaje de fosfatidilserina producida por los eritrocitos, medido con el ensayo de anexina V, es inferior al 10 %, y la cantidad de lactato producido por cada  $10^6$  eritrocitos es mayor que 0,100 nmol/h.
- 45
9. Eritrocitos de acuerdo con la reivindicación 8, en los que dichas una o más sustancias de interés farmacéutico se seleccionan de los siguientes principios activos: péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, corticoesteroides, glucocorticoides, fármacos antirretrovirales y antiinflamatorios,
- 50
10. Eritrocitos de acuerdo con la reivindicación 9, en los que dicho principio activo se selecciona de: prednisolona, fosfato de prednisolona, dexametasona, fosfato de dexametasona, betametasona, fosfato de betametasona, deflazacort, fosforilasa de timidina, fenilalanina amonio liasa.
- 55
11. Una composición farmacéutica que comprende los eritrocitos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
12. Eritrocitos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 o composiciones de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en un tratamiento terapéutico.
- 60
13. Eritrocitos o composiciones de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en un tratamiento terapéutico, en el que dichos ingredientes activos se seleccionan de prednisolona, fosfato de prednisolona, dexametasona, fosfato de dexametasona, betametasona, fosfato de betametasona, deflazacort.
- 65
14. Eritrocitos o composiciones de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, para su uso en un tratamiento terapéutico en el que dichos ingredientes activos se seleccionan de fosfato sódico de dexametasona y fosfato sódico de betametasona.
15. Eritrocitos o composiciones de acuerdo con la reivindicación 14, en los que dicho tratamiento es de ataxia telangiectasia.



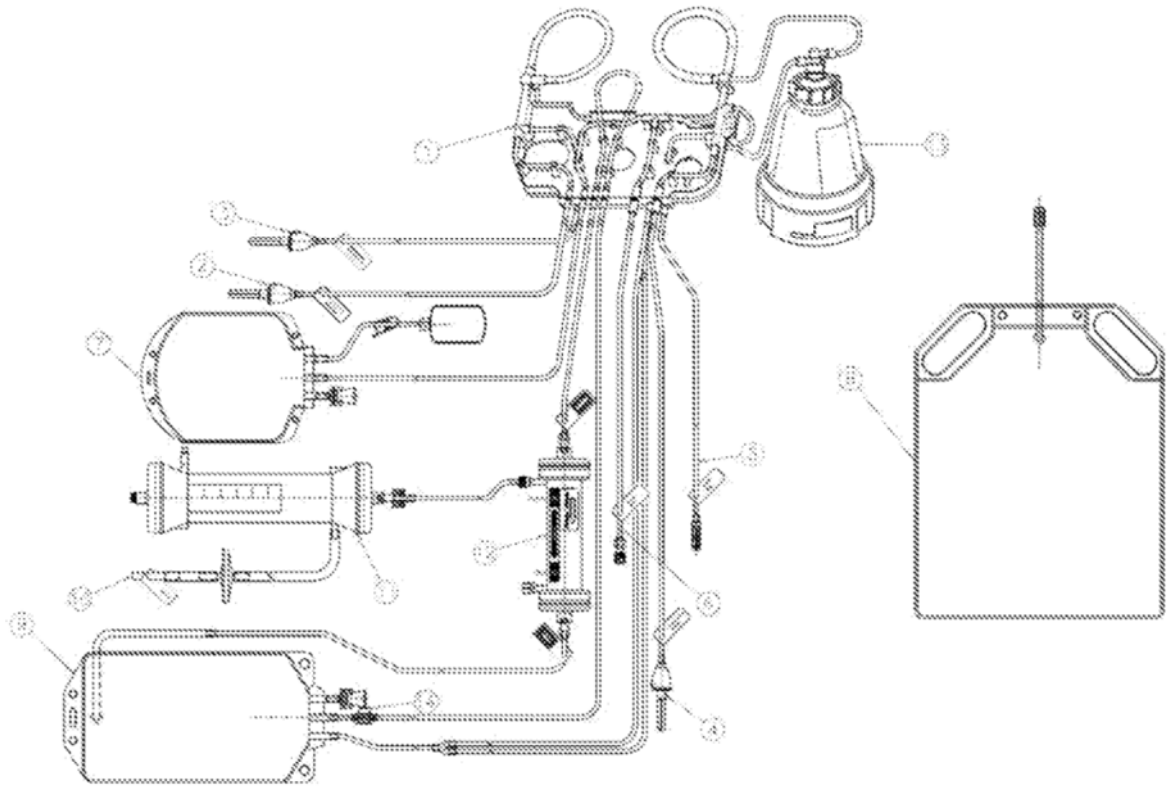


**FIGURA 1**

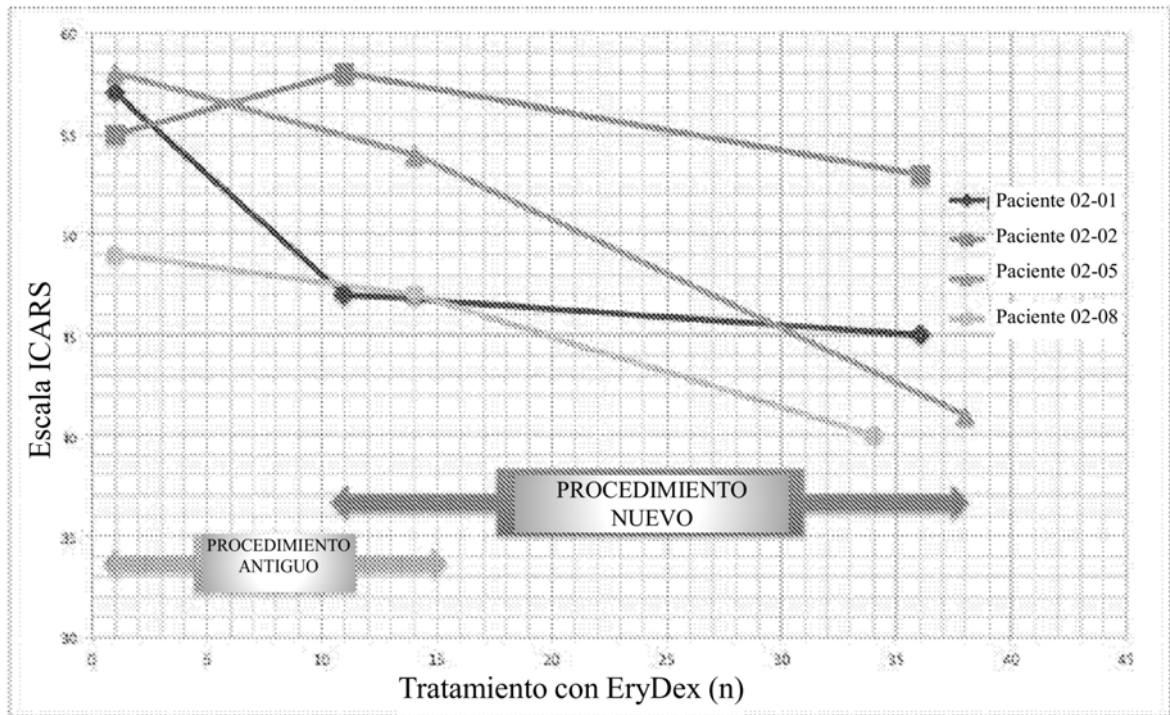
### Curvas de Resistencia Osmótica globular



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**