

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 849**

51 Int. Cl.:

A61K 38/51 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 35/18 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2015 PCT/EP2015/052962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15121348**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2015 E 15705563 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3104875**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan una enzima dependiente de PLP y su cofactor**

30 Prioridad:

12.02.2014 FR 1451100

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

02.03.2021

73 Titular/es:

**ERYTECH PHARMA (100.0%)
60 Avenue Rockefeller
69008 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**GODFRIN, YANN;
BOURGEAUX, VANESSA;
GAY, FABIEN y
CORTESE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 808 849 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

Composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan una enzima dependiente de PLP y su cofactor

- 5 **[0001]** La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una enzima dependiente de PLP, por ejemplo, metioninasa, y un precursor no fosfato de PLP, para su uso como fármaco. La solicitud también describe su procedimiento de producción y un procedimiento de tratamiento terapéutico relacionado con el mismo.
- 10 **[0002]** El fosfato piridoxal (PLP), un derivado de la vitamina B6, es un cofactor utilizado para una gran variedad de enzimas. En la presente invención, denominadas "enzimas PLP" por ser enzimas dependientes de PLP, forman un grupo de alrededor de 145 enzimas distintas involucradas, en su mayoría, en vías metabólicas para transformar aminoácidos. La reacción catalizada mediante estas enzimas incluye descarboxilaciones, transaminaciones o reacciones de eliminación adicionales (Percudani y Perrachi, informes EMBO, Vol. 4 No. 9, 2003).
- 15 **[0003]** Debido al gran número de enzimas pertenecientes al grupo de enzimas PLP y a las reacciones catalizadas por estas últimas, se ha investigado su uso potencial en terapias humanas. Entre las diferentes oportunidades de intervención terapéutica asociadas a las enzimas PLP, su uso en el tratamiento del cáncer y de patologías cardiovasculares ha sido objeto de muchos estudios (El-Sayed y Shindia "Targets in gene therapy" Prof. Yongping You, Ed., 2011). Más particularmente, la metioninasa sería de interés para agotar la disminución de la metionina plasmática y la inducción de la apoptosis de células tumorales auxotróficas para este aminoácido. Se demostró que muchas células tumorales humanas eran incapaces de proliferar cuando la metionina se reemplaza con su precursor homocisteína, mientras que las células normales tienen la capacidad de proliferar en dicho medio. Esta dependencia de metionina se observó especialmente para las líneas celulares derivadas de cánceres de mama, pulmón, colon, riñón, vejiga, melanoma y glioblastoma (Durando y col. Bull Cancer 2008; 95 (1): 69-76).
- 20 **[0004]** A pesar del interés terapéutico de las enzimas PLP, el desarrollo del tratamiento basado en una administración a través de una vía sistémica de estas enzimas se encuentra con limitaciones significativas:
- las enzimas PLP se obtienen principalmente de organismos procariontes y, por lo tanto, son fuertemente
 - 30 inmunogénicas en el caso de la administración a seres humanos
 - su semivida en plasma es corta, requiriendo el recurso a administraciones frecuentes o a grandes dosis para poder obtener suficiente actividad
 - la baja biodisponibilidad del cofactor PLP en plasma provoca una rápida caída de su actividad después de la administración.
- 35 **[0005]** Estas limitaciones se describieron ampliamente en el caso de la metioninasa. Sun y col. han producido una metioninasa recombinante en la bacteria *Escherichia coli* a partir del gen que codifica la enzima extraída de la bacteria *Pseudomonas putida*. La enzima así obtenida llamada rMETasa se inyectó por vía intravenosa en ratones inmunodeficientes. Veinticuatro horas después de la inyección, la actividad plasmática de la enzima, determinada *in vitro* sin añadir PLP, fue indetectable, lo que indica su corto periodo de acción (Sun y col. Cancer Research 63, 8377-8383, 2003).
- 40 **[0006]** Un año más tarde, el mismo equipo publicó los resultados de la administración de rMETasa en macacos (Yang y col. Clinical Cancer Research Vol. 10, 2131-2138, 2004). En este estudio, se administraron dosis de rMETasa de 1.000, 2.000 y 4.000 unidades/kg por vía intravenosa a seis monos. Una segunda inyección se realizó 28 días después de la primera y provocó en dos monos un shock anafiláctico que llevó a la muerte de uno de los dos animales. Además, la inmunogenicidad de rMETasa provocó el desarrollo de anticuerpos anti-rMETasa del tipo IgG (una mayoría) y del tipo IgM para la mayoría de los animales tratados (cuatro de cada seis). La naturaleza neutralizante de estos anticuerpos se demostró *in vitro*.
- 50 **[0007]** Con el fin de superar la corta semivida y las limitaciones de inmunogenicidad de su metioninasa, los mismos autores propusieron entonces recurrir a la pegilación de su enzima. El injerto de grupos PEG es una técnica conocida para aumentar la semivida y reducir la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas. Los derivados de PEG activados se pusieron en presencia de rMETasa para obtener PEG-rMETasa. Esta modificación de la enzima provocó un aumento en la semivida en ratones de 2 h para la enzima libre a 38 h para la PEG-rMETasa. Este aumento significativo en la semivida va acompañado de una reducción de la inmunogenicidad (Sun y col. Cancer Research 63, 8377-8383, 2003).
- 55 **[0008]** Si la pegilación satisface parcialmente los problemas de semivida e inmunogenicidad, queda un problema importante de las enzimas PLP: la baja biodisponibilidad del cofactor en el plasma. Las enzimas PLP son catalíticamente activas en presencia de su cofactor, PLP, a continuación, esto se conoce como holoenzima. Después de la inyección, la holoenzima se convierte rápidamente en una apoenzima inactiva debido a la pérdida del cofactor PLP.
- 60 **[0009]** El PLP traído de forma exógena no está disponible rápidamente para la enzima, la semivida plasmática
- 65

del PLP libre es de solo unos 15 minutos. Este fenómeno se demostró en el caso de la enzima PLP, tirosina fenoliasa (TPL). Elmer y col. (Cancer Research 38; 3663-3667, 1978) purificaron TPL y la inyectaron en ratones normales. Cinco horas después de la inyección, se tomaron muestras de sangre para analizar la actividad de la TPL. Este ensayo de actividad se llevó a cabo según dos condiciones: una porción de las muestras se sometió a ensayo sin añadir PLP, la otra porción se sometió a ensayo con la adición de una cantidad óptima de PLP en la mezcla de reacción para el ensayo (ambas condiciones reflejan la actividad realmente medida en plasma y la actividad potencial de la enzima si tuvo acceso a su cofactor PLP). La comparación de los resultados obtenidos muestra que solo el 7 % de la actividad potencial de la TPL se mide realmente en el plasma. La misma prueba se llevó a cabo con un grupo de ratones, donde, de forma concomitante con la inyección de TPL, se administró una gran cantidad de PLP y, a continuación, se llevaron a cabo reinyecciones de PLP a cada hora. En este escenario, la comparación de los resultados del ensayo muestra que el 37 % de la actividad potencial se mide realmente en el plasma. Por lo tanto, la coadministración de PLP brindó la posibilidad de mejorar de manera limitada la actividad de TPL en plasma. Sin embargo, el PLP proporcionado de forma exógena no está disponible rápidamente para la TPL, la semivida plasmática del PLP libre es de unos 15 minutos. Por lo tanto, el aumento del nivel plasmático de PLP mediante inyecciones repetidas de PLP en solución no es factible. Elmer y col. propusieron la provisión de PLP de forma prolongada a lo largo del tiempo a través de un implante que consiste en espermatozoides y aceite de cacahuete inyectado a través de una vía intramuscular en la cadera. Sin embargo, esta solución no resultó convincente, no logra restablecer la actividad realmente medida en plasma más allá del 25 % de la actividad potencial y no mejora de manera estadísticamente significativa el efecto antitumoral de TPL en ratones implantados con un tumor de melanoma B-16. Se realizaron observaciones similares con metioninasa. Sun y col. (Cancer Research 63, 8377-8383, 2003) determinan que, *in vitro*, la holoenzima PLP-rMETasa es relativamente estable pero que, *in vivo*, este complejo se disocia rápidamente, lo que conduce a una pérdida de actividad de la rMETasa. Los autores muestran además que la duración de la disminución de metionina obtenida con rMETasa así como también con PEG-rMETasa puede mejorarse mediante un complemento de PLP mediante la implantación de una bomba de PLP (una bomba que administra PLP de manera continua). Sin embargo, este dispositivo de administración continua invariablemente se enfrentará al problema de la baja biodisponibilidad de PLP en plasma.

[0010] Por lo tanto, aunque el potencial terapéutico de las enzimas PLP ha sido objeto de mucho trabajo de investigación, en particular habiendo llevado a la metioninasa para realizar ensayos clínicos piloto, no se pudo proporcionar ninguna demostración de la eficacia clínica de estas enzimas.

[0011] Por consiguiente, con el propósito de utilizar el potencial terapéutico de las enzimas PLP, sería ventajoso tener una solución que permita mantener estas enzimas en presencia de una cantidad óptima y disponible de PLP.

[0012] Se han descrito varios procedimientos para permitir la incorporación de ingredientes activos en eritrocitos. Entre estos procedimientos, la llamada técnica de resellado de lisis es la más extendida. Esta técnica comprende tres alternativas, que son diálisis hipotónica, "prehinchamiento" hipotónico y dilución hipotónica, todas basadas en la diferencia de presión osmótica entre el interior y el exterior de los eritrocitos. Estas alternativas tienen en común las cinco etapas siguientes: los glóbulos rojos empaquetados se lavan y centrifugan una o varias veces con un amortiguador fisiológico, los eritrocitos se ponen en contacto con un medio líquido hipotónico que resulta en la apertura de poros en la membrana eritrocitaria, el ingrediente activo entra en los eritrocitos, los poros se cierran (se "resellan") por medio de un amortiguador hipertónico, confinando el ingrediente activo dentro de los eritrocitos, y estos últimos, a continuación, se suspenden en una solución de conservación. La técnica de diálisis hipotónica es la técnica más interesante y ha sido objeto de desarrollos industriales. La descrita en EP 1 773 452 es la más efectiva en la actualidad, tiene la ventaja de ser reproducible y de mejorar la tasa de encapsulación del ingrediente activo.

[0013] La encapsulación de enzimas en eritrocitos, con el fin de limitar los riesgos relacionados con la inmunogenicidad de la enzima para prolongar su semivida ya se propuso en trabajos de investigación que fueron objeto de publicaciones científicas. La encapsulación de una enzima, L-asparaginasa, se describió en el documento EP 1 773 452, así como también se describió la arginina deiminasa en el documento EP 1 874 341.

[0014] Los estudios anteriores no se refieren a una enzima que requiera un cofactor y no abordan la complejidad relacionada con la cinética de una enzima PLP y de su cofactor PLP.

[0015] V. Agrawal y col. (Expert Opin. Biol. Ther. 2012, 12(1): 53-61) es un artículo de reseña que describe un resumen de la investigación que se está llevando a cabo para investigar la auxotrofia de metionina como objetivo para el tratamiento del cáncer. El artículo menciona la pegilación de rMetasa y su encapsulación en eritrocitos. Sin embargo, el artículo no describe una composición basada en eritrocitos que encapsulan metioninasa y que comprende además un precursor no fosfato de PLP.

[0016] Un objetivo de la invención es proporcionar una composición farmacéutica que contenga una enzima PLP, que permita limitar los riesgos relacionados con la inmunogenicidad de la enzima, prolongar su semivida, mientras pone la enzima en presencia de una cantidad óptima y disponible de su cofactor PLP.

[0017] La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- [0018]** Por consiguiente, el objetivo de la invención comprende una suspensión de eritrocitos en un vehículo farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica que comprende eritrocitos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde los eritrocitos encapsulan una enzima PLP. Esto se denominará, en lo sucesivo, como composición, para hacer referencia igualmente a la suspensión y la composición farmacéutica. "Encapsular" significa que el ingrediente activo (enzima y opcionalmente cofactor y/u otra molécula) está esencial o totalmente presente en el interior. "Esencialmente" significa que una proporción minoritaria del ingrediente activo puede encontrarse atrapada en la membrana.
- 10 **[0019]** La composición contiene especialmente de 0,01 a 30, preferentemente de 0,05 a 10 mg de enzima PLP por ml de glóbulos rojos.
- [0020]** Según una primera realización, la enzima PLP es metioninasa, también llamada, *inter alia*, L-metioninasa, metionina gamma liasa MGL, número EC 4.4.1.11, número CAS 42616-25-1. Para conocer las fuentes de metioninasa que se pueden usar según la invención, se puede mencionar especialmente la publicación de El Sayed A, Applied Microbiol. Biotechnol. (2010) 86: 445-467.
- 15 **[0021]** Según una segunda realización, la enzima PLP es tirosina fenol-liasa o TPL, EC 4.1.99.2, CAS 9059-31-8. Se puede hacer referencia a H. Kumagai y col., J. Biol. Chem. 245, 7: 1767-72 y 245, 7: 1773-7.
- 20 **[0022]** Según una tercera realización, la enzima PLP es tirosina aminotransferasa (hTATasa), EC 2.6.1.5, CAS 9014-55-5. Se puede hacer referencia a R. Rettenmeier y col., Nucleic Acids Res. 1990, 18, 13: 3583-61.
- [0023]** Según una cuarta realización, la enzima PLP es cistationina beta-sintasa o sintasa, EC 4.2.1.22, CAS 25 9023-99-8. Se puede hacer referencia a J. Kraus y col., J. Biol. Chem. 1978, 253, 18: 6523-8.
- [0024]** La composición comprende un precursor no fosfato del cofactor de la enzima, es decir, PLP, cuyo precursor es una forma no fosfatada de vitamina B6. La composición puede comprender un precursor de fosfato tal como fosfato de piridoxina (PNP).
- 30 **[0025]** La vitamina B6 existe en diferentes formas, ya sea fosfatadas o no fosfatadas. El fosfato de piridoxina (PNP), el fosfato piridoxal (PLP) y el fosfato piridoxamina (PMP) son sus formas fosfatadas. Las formas no fosfatadas correspondientes son piridoxina (PN), piridoxal (PL) y piridoxamina (PM). Las formas no fosfatadas de vitamina B6 pueden atravesar la membrana eritrocitaria, que las formas fosfatadas solo pueden atravesar con dificultad. Según la ruta predominante (según lo descrito por Anderson y col. J. Clin. Invest. 1971, Vol. 50, 1901-1909), la piridoxina (PN) se transforma dentro de los eritrocitos en PNP bajo el efecto de PN quinasa, PNP se transforma en PLP bajo el efecto de PNP oxidasa. El PLP puede transformarse entonces en piridoxal (PL) bajo el efecto de PLP-fosfatasa y el PL puede dejar los eritrocitos. Se entiende fácilmente que el precursor proporcionado es capaz de experimentar transformaciones en los eritrocitos durante el procedimiento de preparación o durante el almacenamiento de la composición.
- 35 40 **[0026]** Por una forma no fosfatada de vitamina B6, se entenderá, en esta invención, uno de los tres "vitámeros" de vitamina B6 o una mezcla de dos o tres vitámeros: PL, PN y PM. Se prefiere la forma PN. También pueden tener la forma de una sal.
- 45 **[0027]** La solicitud describe que la composición comprende PLP encapsulado en eritrocitos. El PLP puede proporcionarse durante el procedimiento de encapsulación u obtenerse total o parcialmente en los eritrocitos de su precursor. El PLP presente o formado puede estar asociado a la enzima. Por lo tanto, la composición puede comprender la holoenzima correspondiente, por ejemplo, metioninasa-PLP. En estas condiciones, la semivida de la enzima activa, como se observa, por ejemplo, con la duración de la disminución plasmática de su sustrato, aumenta considerablemente. La composición según la invención proporciona especialmente la posibilidad de preservar la actividad enzimática más allá de 24 horas después de la administración, especialmente en o más de 1, 5, 10 o 15 días. Por actividad enzimática se entiende especialmente una disminución de más del 20, 30, 40 o 50 % del sustrato en el plasma.
- 50 55 **[0028]** En una realización, la composición comprende una forma no fosfatada de vitamina B6 y un precursor de fosfato, fosfato de piridoxina (PNP) y/o fosfato de piridoxamina (PMP).
- [0029]** La PNP y/o PMP se encapsula dentro de los eritrocitos dentro de la composición. Este precursor puede coencapsularse con la enzima u obtenerse total o parcialmente en los eritrocitos de su propio precursor.
- 60 **[0030]** La composición comprende especialmente de alrededor de 0,05 a alrededor de 600, especialmente de alrededor de 0,5 a alrededor de 100, preferentemente de alrededor de 5 a alrededor de 50 μ moles de PLP y/o PNP y/o PMP, encapsulados por litro (L) de glóbulos rojos.
- 65

- 5 **[0031]** La solicitud describe una composición que comprende eritrocitos que encapsulan la enzima PLP y PLP y además un precursor de PLP no fosfato, encapsulado en los eritrocitos, presente dentro de los eritrocitos o presente dentro y fuera de los eritrocitos. Este precursor no fosfato es PN, PL o PM, preferentemente PN, o una mezcla de dos o tres de estos compuestos. El precursor no fosfato puede estar presente dentro y/o fuera de los eritrocitos. La presencia de este precursor no fosfato ofrece la posibilidad de alcanzar un nivel de PLP intraeritrocitario especialmente más alto que en ausencia de este precursor no fosfato.
- 10 **[0032]** La solicitud describe una composición que comprende eritrocitos que encapsulan la enzima PLP y además PLP y uno de sus precursores de fosfato, PNP, PLP y/o PMP. Esta misma composición puede comprender además ventajosamente un precursor no fosfato, particularmente PN, como se acaba de describir.
- [0033]** Las composiciones según la invención preferentemente tienen un hematocrito mayor o igual al 35, 40 o 45 %.
- 15 **[0034]** Según una realización, la composición comprende eritrocitos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, los eritrocitos que encapsulan la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, por un lado, y, vitamina B6 en una forma no fosfatada, preferentemente PN, por otro, para administración simultánea, separada o secuencial. La composición puede tener especialmente la forma de un kit, que comprende por separado los eritrocitos (suspensión) y la vitamina B6 en una forma no fosfatada, preferentemente PN (solución). Según una realización, el vehículo
20 farmacéuticamente aceptable es una "solución de conservación" para eritrocitos, es decir, una solución en la que los eritrocitos que encapsulan un ingrediente activo se suspenden en su forma adecuada para ser almacenados mientras esperan su inyección. Preferentemente, una solución de conservación comprende al menos un agente que promueve la conservación de los eritrocitos, particularmente seleccionado de entre glucosa, dextrosa, adenina y manitol. Ventajosamente, la solución de conservación contiene fosfato inorgánico que permite la inhibición de la enzima
25 intraeritrocitaria PLP-fosfatasa.
- [0035]** La solución de conservación puede ser una solución acuosa que comprende NaCl, adenina y al menos un compuesto de entre glucosa, dextrosa y manitol. Según una característica, comprende además un fosfato inorgánico.
30
- [0036]** La solución de conservación puede comprender NaCl, adenina y dextrosa, preferentemente un medio AS3. Según una característica, comprende además un fosfato inorgánico.
- [0037]** La solución de conservación puede comprender NaCl, adenina, glucosa y manitol, preferentemente un
35 medio SAG-manitol o ADSol. Según una característica, comprende además un fosfato inorgánico.
- [0038]** En particular, la composición o suspensión, en una solución de conservación, se caracteriza por un nivel de hemoglobina extracelular mantenido a un nivel igual o inferior a 0,5, en particular 0,3, especialmente 0,2, preferentemente 0,15, incluso mejor 0,1 g/dl a 72 h y conservación a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
40
- [0039]** En particular, la composición o suspensión, en una solución de conservación, se caracteriza por un nivel de hemoglobina extracelular mantenido a un nivel igual o inferior a 0,5, en particular 0,3, especialmente 0,2, preferentemente 0,15, incluso mejor 0,1 g/dl, durante un período comprendido entre 24 h y 20 días, especialmente entre 24 y 72 h, y una conservación a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
45
- [0040]** El nivel de hemoglobina extracelular se mide ventajosamente mediante el procedimiento de referencia manual descrito en G. B. Blakney y A. J. Dinwoodie, Clin. Biochem. 8, 96-102, 1975. También existen dispositivos automáticos que permiten realizar esta medición con una sensibilidad específica para ellos.
- 50 **[0041]** En particular, la composición o suspensión, en una solución de conservación, se caracteriza por una velocidad de hemólisis mantenida a un porcentaje igual o menor que 2, particularmente 1,5, preferentemente el 1 % a las 72 h y una conservación a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
- [0042]** En particular, la composición o suspensión, en una solución de conservación, se caracteriza por una
55 velocidad de hemólisis mantenida a un porcentaje igual o menor que 2, particularmente 1,5, preferentemente el 1 % durante un período comprendido entre 24 h y 20 días, particularmente entre 24 y 72 h, y a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
- [0043]** En particular, el hematocrito de la suspensión es igual o superior al 35, 40 o 45 %.
60
- [0044]** Según un procedimiento particular, el metabolismo de la vitamina B6 en eritrocitos se modifica para aumentar la concentración de PLP intraeritrocitario mediante el aumento de los niveles intraeritrocitarios de PN quinasa y PNP oxidasa y/o mediante la reducción del nivel intraeritrocitario de PLP-fosfatasa.
- 65 **[0045]** Según una característica, la composición comprende, además de la enzima PLP, por ejemplo,

metioninasa, y un precursor de PLP, PN quinasa y/o PNP oxidasa y/o un agente que inhibe la PLP-fosfatasa. Estas enzimas o agentes pueden encontrarse encapsulados en los eritrocitos o encontrarse fuera y dentro de los eritrocitos.

5 **[0046]** Estas (esta) enzimas o agentes también se pueden administrar por separado, al mezclarse especialmente con la formulación de vitamina B6 no fosfato cuando se separa de la suspensión de eritrocitos.

[0047] El objetivo de la invención es, por consiguiente, tales composiciones para su uso como fármaco.

10 **[0048]** El objeto de la invención es, en especial, un fármaco que ofrece la posibilidad de proporcionar, a un paciente que lo necesita, una enzima PLP y su cofactor, en condiciones de buena biodisponibilidad, lo que significa que la enzima y su cofactor están disponibles entre sí y en una cantidad efectiva para que la enzima sea activa y eficiente en una aplicación terapéutica. El fármaco especialmente apunta a la disminución o la reducción de la concentración plasmática o circulante y/o la concentración en un órgano, de un sustrato de la enzima.

15 **[0049]** Según un primer subobjeto, el fármaco comprende metioninasa y permite la disminución o la reducción de la metionina plasmática o circulante en un paciente que lo necesita. El fármaco es un fármaco contra el cáncer que permite el tratamiento de un cáncer, especialmente un cáncer que comprende células tumorales auxotróficas para la metionina, especialmente, cáncer de mama, pulmón, colon, riñón, vejiga, melanoma y glioblastoma.

20 **[0050]** Según un segundo subobjeto, el fármaco comprende metioninasa y permite la disminución o la reducción de la homocisteína plasmática o circulante o hepática en un paciente que lo necesita. El fármaco permite el tratamiento de la homocistinuria y/o hiperhomocisteinemia y/o patologías asociadas, tales como una enfermedad cardiovascular, del sistema nervioso central, del sistema ocular y/o del esqueleto (El-Sayed y Shindia Targets in gene therapy Prof. Yongping You, Ed., 2011).

25 **[0051]** Según el tercer subobjeto, de la invención, el fármaco contiene TPL y permite la disminución o la reducción de la tirosina plasmática o circulante en un paciente que lo necesita. El fármaco es un fármaco contra el cáncer, que permite el tratamiento de un cáncer, en especial un cáncer que comprende células tumorales auxotróficas para la tirosina, especialmente, un melanoma.

30 **[0052]** Según un cuarto subobjeto de la invención, el fármaco contiene hTATasa y permite el agotamiento o reducción de la tirosina plasmática o circulante y/o hepática en un paciente que lo necesita. El fármaco permite el tratamiento de una enfermedad rara relacionada con una deficiencia en esta enzima PLP, especialmente, el síndrome de Richner-Hanhart (tirosinemia de tipo II).

35 **[0053]** Según un quinto subobjeto de la invención, el fármaco contiene cistationina beta-sintasa y permite la disminución o la reducción de la homocisteína plasmática o circulante y/o hepática en un paciente que lo necesita. El fármaco permite el tratamiento de la homocistinuria y/o la hiperhomocisteinemia y/o patologías asociadas, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad del sistema nervioso central, una enfermedad del sistema ocular y/o una enfermedad del esqueleto.

45 **[0054]** La invención de la solicitud también describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan una enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, un vehículo farmacéuticamente aceptable y fosfato piridoxal (PLP) y opcionalmente un precursor de PLP fosfato o no fosfato, un procedimiento que comprende las siguientes etapas: opcional y preferentemente, una pastilla de glóbulos rojos se lava y centrifuga una o varias veces con un amortiguador fisiológico; la suspensión eritrocitaria se pone en contacto con un medio líquido hipotónico que produce la apertura de poros en la membrana eritrocitaria; la suspensión de eritrocitos se pone en contacto con la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, antes y después de abrir los poros; la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, entra en los eritrocitos; los poros se cierran mediante un amortiguador isotónico o hipertónico, ventajosamente hipertónico, y se recoge una suspensión de eritrocitos resellados que contienen la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa; opcionalmente, la suspensión de eritrocitos se incuba para eliminar los eritrocitos más frágiles; la suspensión de eritrocitos se lava y acondiciona con una solución de conservación; un procedimiento donde:

- 55 - el PLP y/o, si está presente, un precursor de fosfato de PLP, se encapsula conjuntamente con la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa,
- si está presente, el precursor de PLP no fosfato se añade a la suspensión de eritrocitos antes y/o después de abrir los poros, y/o
- si está presente, el precursor de PLP no fosfato se añade durante la incubación o a la solución de conservación.

60 **[0055]** Preferentemente, algunos PLP se encapsulan conjuntamente con la enzima PLP y al menos un precursor no fosfato, tal como PN, PL y/o PM, se agrega a la suspensión de eritrocitos antes y/o después de abrir los poros, y/o durante la incubación y/o a la solución de conservación. Preferentemente, el precursor no fosfato es PN.

[0056] La suspensión eritrocitaria se pone en contacto con un medio líquido hipotónico que produce la apertura de poros en la membrana eritrocitaria. Se observa que existen tres alternativas en la técnica de resellado por lisis, que

son diálisis hipotónica, prehinchamiento hipotónico y dilución hipotónica, todas basadas en la diferencia de presión osmótica entre el interior y el exterior de los eritrocitos. Se prefiere la diálisis hipotónica.

[0057] La suspensión de eritrocitos que encapsulan la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, y opcionalmente PLP y/o un precursor de PLP, es especialmente capaz de obtenerse con el siguiente procedimiento:

- 1 - suspender un precipitado de eritrocitos en una solución isotónica a un nivel de hematocritos igual o superior al 65 %, enfriando entre +1 y +8 °C,
- 2 - un procedimiento de lisis, a una temperatura mantenida entre +1 y +8 °C, que comprende la etapa de la suspensión de eritrocitos a un nivel de hematocrito igual o mayor que el 65 % y de una solución de lisis hipotónica enfriada entre +1 y +8 °C, a un dispositivo de diálisis, tal como una bobina o un cartucho de diálisis (se prefiere el cartucho);
- 3 - un procedimiento de encapsulación mediante la adición, preferentemente de manera gradual, del ingrediente o ingredientes activos a encapsular (especialmente en una solución preparada de manera previa) en la suspensión antes o durante la lisis, a una temperatura mantenida entre +1 y +8 °C; y
- 4 - un procedimiento de resellado llevado a cabo en presencia de una solución isotónica o hipertónica, ventajosamente hipertónica, a una temperatura más alta, especialmente comprendida entre +30 y +42 °C.

[0058] Como alternativa preferida, es posible inspirarse en el procedimiento descrito en el documento WO-A-2006/016247 (EP 1 773 452):

- 1 - suspender un precipitado de eritrocitos en una solución isotónica a un nivel de hematocritos igual o superior al 65 %, enfriando entre +1 y +8 °C,
- 2 - medir la fragilidad osmótica a partir de una muestra de eritrocitos de este mismo precipitado,
- 3 - un procedimiento de lisis, a una temperatura mantenida entre +1 y +8 °C, que comprende la etapa de la suspensión de eritrocitos a un nivel de hematocrito igual o mayor que 65 % y de una solución de lisis hipotónica enfriada entre +1 y +8 °C, a un dispositivo de diálisis, tal como una bobina o un cartucho de diálisis (se prefiere el cartucho); los parámetros de lisis se ajustan según la fragilidad osmótica medida anteriormente; especialmente, dependiendo de la fragilidad osmótica medida, se ajusta el flujo de la suspensión de eritrocitos que pasa al dispositivo de diálisis o se ajusta la osmolaridad de la solución de lisis; y
- 4 - un procedimiento de encapsulación mediante la adición, preferentemente de manera gradual, del ingrediente o ingredientes activos a encapsular (especialmente en una solución elaborada previamente) en la suspensión antes y durante la lisis, a una temperatura mantenida entre +1 y +8 °C; y
- 5 - un procedimiento de resellado llevado a cabo en presencia de una solución isotónica o hipertónica, ventajosamente hipertónica, a una temperatura más alta, especialmente comprendida entre +30 y +42 °C.

[0059] Especialmente, para la diálisis, la pastilla de eritrocitos se suspende en una solución isotónica con un alto nivel de hematocritos, igual o superior al 65 %, y preferentemente igual o superior al 70 %, y esta suspensión se enfría entre +1 y +8 °C, preferentemente entre +2 y +6 °C, típicamente alrededor de +4 °C. Según un procedimiento particular, el nivel de hematocritos está comprendido entre el 65 y 80 %, preferentemente entre el 70 y 80 %.

[0060] Cuando se mide, la fragilidad osmótica se mide ventajosamente en eritrocitos justo antes de la etapa de lisis, en presencia o en ausencia, preferentemente en presencia del ingrediente o ingredientes activos a encapsular. Los eritrocitos o la suspensión que los contiene se encuentran ventajosamente a una temperatura cercana o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. Según otra característica ventajosa de la invención, la medición conducida de la fragilidad osmótica se utiliza rápidamente, es decir, el procedimiento de lisis se lleva a cabo en poco tiempo después de tomar la muestra. Preferentemente, este lapso de tiempo entre el muestreo y el comienzo de la lisis es menor o igual a 30 minutos, lo que es aún mejor, menor o igual a 25, e incluso a 20 minutos.

[0061] En cuanto a cómo llevar a cabo el procedimiento de resellado por lisis con medición y teniendo en cuenta la fragilidad osmótica, un experto en la materia puede referirse para más detalles al documento WO-A-2006/016247.

[0062] En la invención FR 1 354 204 presentada el 7 de mayo de 2013, a la que puede referirse un experto en la materia, se describió una mejora de las técnicas de encapsulación. Por consiguiente, según una realización, los eritrocitos que encapsulan los ingredientes activos, es decir, la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, y opcionalmente uno o varios otros ingredientes activos tales como PLP y/o un precursor de PLP, se obtienen mediante un procedimiento que comprende la encapsulación del ingrediente activo dentro de los eritrocitos mediante resellado por lisis, la obtención de una suspensión o de un sedimento que comprende eritrocitos que incorporan el ingrediente activo y una solución con una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg, la incubación de la pastilla o de la suspensión como tal o después de agregar una solución de incubación, a una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular, entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg. La incubación se lleva a cabo especialmente durante un período mayor o igual a 30 minutos, en particular mayor o igual a 1 h. A continuación, se procede a retirar el medio líquido de la solución incubada y los eritrocitos obtenidos se suspenden en una solución que permite la inyección de la suspensión en un

paciente, preferentemente una solución de conservación que permite la inyección de la suspensión en un paciente. La osmolalidad indicada es la de la solución en la que se suspenden los eritrocitos o en un precipitado en el momento pertinente.

- 5 **[0063]** Según un procedimiento particular, se proporciona un precursor de PLP no fosfato durante el procedimiento de producción o almacenamiento o en la formulación final. Este compuesto puede incorporarse, por ejemplo, en la solución de incubación o en la solución de conservación, o adicionalmente en la formulación antes de la inyección cuando se lleva a cabo una dilución previa a la inyección.
- 10 **[0064]** Según una característica, especialmente de 0,1 a 250, preferentemente de 1 a 50 mM de PN y/o de PL y/o de PM se proporcionan durante el procedimiento de producción o almacenamiento o en la formulación final. Como se describió anteriormente, una fracción de estos derivados no fosfato de la vitamina B6 se convertirá en PLP en los glóbulos rojos.
- 15 **[0065]** Por "suspensión de eritrocitos estabilizada", se entiende especialmente una suspensión que tiene un contenido de hemoglobina extracelular que permanece menor o igual a 0,2 g/dl hasta su uso en humanos, este último puede intervenir, en especial, de 1 a 72 horas después de producir el lote de eritrocitos que incorpora el ingrediente activo.
- 20 **[0066]** Con "suspensión de eritrocitos estabilizada lista para usar" se hace referencia a la suspensión estabilizada en una solución que permite la inyección en un paciente, particularmente en una solución de conservación. Su hematocrito es generalmente igual o superior al 35, 40 o 45 %.
- [0067]** Por "sedimento eritrocitario" se entiende un concentrado o concentración de eritrocitos recogidos
25 después de separar los eritrocitos del medio líquido en el que se suspendieron previamente. La separación puede garantizarse mediante filtración o centrifugación. La centrifugación es el medio generalmente utilizado para dicha separación. Un sedimento comprende una determinada proporción de medio líquido. Generalmente, la pastilla tiene un hematocrito comprendido entre el 70 y el 85 %.
- 30 **[0068]** Por "solución de incubación" se entiende la solución en la que los eritrocitos que encapsulan un ingrediente activo están presentes durante la etapa de incubación. La incubación se puede lograr en un amplio rango de hematocritos, particularmente entre el 10 y el 85 % de hematocrito.
- [0069]** Por "eritrocitos frágiles" se entienden los eritrocitos derivados del procedimiento de incorporación que,
35 una vez suspendidos en una solución de conservación, pueden lisarse cuando la suspensión se conserva entre 2 y 8 °C, especialmente después de 1 a 72 h.
- [0070]** Por "hematocrito inicial" se entiende el hematocrito antes de la pérdida celular debido a la lisis de los eritrocitos frágiles durante la incubación.
- 40 **[0071]** El procedimiento puede comprender especialmente las etapas siguientes:
- (a) encapsular el ingrediente o ingredientes activos que se van a encapsular (enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, y opcionalmente PLP y/o un precursor de PLP) dentro de los eritrocitos, lo que comprende la puesta
45 de los eritrocitos en contacto con un medio hipotónico (que permite la apertura de poros en la membrana de los eritrocitos), entablar el contacto con el ingrediente activo (para permitirle entrar en los eritrocitos), resellar de los eritrocitos, especialmente por medio de un medio isotónico o hipertónico, ventajosamente hipertónico,
- (b) obtener o preparar una suspensión o sedimento que comprende eritrocitos que incorporan el ingrediente activo y una solución con una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular, entre alrededor de 280 y
50 alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg,
- (c) incubar la pastilla o la suspensión de la etapa (b) como tal o después de agregar una solución de incubación, a una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg, durante un período mayor o
55 igual a 30 minutos, especialmente mayor o igual a 1 h,
- (d) retirar el medio líquido de la suspensión incubada de la etapa c),
- (e) suspender los eritrocitos obtenidos en (d) en una solución que permita la inyección de la suspensión en un paciente, preferentemente, una solución de conservación que permita la inyección de la suspensión en un paciente.
- [0072]** La vitamina B6 en la forma no fosfato puede añadirse durante la etapa de encapsulación, en la etapa
60 (a) o durante la incubación en la etapa (c) o, adicionalmente, en la solución de conservación.
- [0073]** Según un primer procedimiento, la etapa posterior a la encapsulación mediante cierre por lisis, particularmente la etapa (b), incluye al menos 1 ciclo de lavado, preferentemente 2 o 3 ciclos de lavado, mediante dilución de la suspensión o sedimento obtenido en la etapa de cierre por lisis o etapa (a) en una solución, a una
65 osmolalidad mayor que igual a 280 mOsmol/kg, en particular entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg,

preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg, y, a continuación, obtener un sedimento de eritrocitos o una suspensión. Esta pastilla o suspensión comprende eritrocitos que incorporan el ingrediente activo y una solución con una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular, entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg. A continuación, se aplican las siguientes etapas, por ejemplo, (c), (d) y (e).

[0074] Según un segundo procedimiento, en la etapa de resellado por lisis o la etapa (a), el resellado de los eritrocitos mediante un medio isotónico o hipertónico produce la suspensión de eritrocitos que, a continuación, pueden estar sujetos a una incubación, por ejemplo, la suspensión de la etapa (b), en una solución con una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular, entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg. En otras palabras, la etapa o etapa de resellado de lisis (a) incluye una etapa para resellar los eritrocitos donde los eritrocitos suspendidos que encapsulan un ingrediente activo se mezclan con una solución de resellado isotónica o hipertónica, ventajosamente hipertónica, produciendo una suspensión de eritrocitos con una osmolalidad mayor o igual a 280 mOsmol/kg, en particular, entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg. En este procedimiento, la etapa de incubación o etapa (c) comprende la incubación de la suspensión que deriva del resellado. La incubación se lleva a cabo durante un período mayor o igual a 30 minutos, especialmente mayor o igual a 1 h. A continuación, se aplican las siguientes etapas, por ejemplo, (d) y (e).

[0075] Las etapas posteriores al resellado por lisis, por ejemplo, (b) a (e), se llevan a cabo en condiciones que resultan en la lisis de eritrocitos frágiles, o de la mayoría de ellos, especialmente más del 50, 60, 70, 80 o 90 %, o más. Para hacer esto, es posible actuar sobre el periodo de incubación, la temperatura de incubación y sobre la osmolalidad de la solución en la que se suspenden los eritrocitos. Cuanto más alta sea la osmolalidad, más largo puede ser el tiempo de incubación. Por consiguiente, cuanto menor sea la osmolalidad, más corta puede ser la incubación para obtener el mismo efecto. Además, cuanto más alta sea la temperatura, más corto puede ser el tiempo de incubación y viceversa. Uno o varios ciclos de lavado permitirán entonces la eliminación de desechos celulares y hemoglobina extracelular, así como también el ingrediente activo extracelular.

[0076] Un ciclo de lavado comprende la dilución de la suspensión o pastilla de eritrocitos, y, a continuación, la separación entre los eritrocitos y la solución de lavado. Preferentemente, una etapa de lavado comprende preferentemente 2 o 3 ciclos de dilución-separación. La separación puede lograrse por cualquier medio adecuado, tal como filtración y centrifugación. Se prefiere la centrifugación.

[0077] La incubación no está limitada por el hematocrito de la suspensión. De esta manera, se puede incubar una suspensión que tiene un hematocrito inicial generalmente comprendido entre el 10 y el 85 %, particularmente entre el 40 y el 80 %. Esto se conoce más bien como una pastilla del 70 % y como una suspensión por debajo de este valor.

[0078] La etapa de eliminación o etapa (d) tiene como objetivo eliminar la parte líquida de la suspensión o de la pastilla incubada, con el fin de retirar especialmente los desechos celulares y la hemoglobina extracelular, así como también, en consecuencia, el ingrediente activo extracelular.

[0079] Según un primer procedimiento para la etapa de eliminación o etapa (d), la separación, en especial, la centrifugación, se lleva a cabo, siendo esto especialmente aplicable a una suspensión. Esta separación puede ser seguida por uno o varios, por ejemplo, 2 o 3, ciclos de lavado, por dilución en una solución isotónica y, a continuación, la separación, en especial, por centrifugación.

[0080] Según un segundo procedimiento para la etapa de eliminación o etapa (d), se lleva a cabo la dilución antes de la separación, en especial, la centrifugación, que es aplicable a una suspensión o a una pastilla. La dilución puede llevarse a cabo, en especial, con una solución de lavado isotónica o con una solución de conservación.

[0081] La etapa final o etapa (e) consiste en preparar la suspensión final de modo que pueda administrarse al paciente, sin ningún otro tratamiento.

[0082] Según un primer procedimiento para esta etapa, se lleva a cabo una dilución de la pastilla eritrocitaria de la etapa de eliminación o etapa (d) con la solución de inyección, en especial, la solución de conservación.

[0083] Según un segundo procedimiento para esta etapa, se llevan a cabo uno o varios ciclos para lavar la pastilla eritrocitaria derivada de la etapa de eliminación o etapa (d) con la solución de inyección, particularmente la solución de conservación, mediante dilución seguida de separación. Después del lavado, los eritrocitos se vuelven a suspender en la solución inyectable, especialmente en la solución de conservación.

[0084] El procedimiento puede comprender además una, varias o la totalidad de las siguientes características:

- la etapa de incubación o la etapa (c) se realiza a una temperatura comprendida entre aproximadamente 2 y

- aproximadamente 39 °C, durante un tiempo suficiente para garantizar la lisis de eritrocitos frágiles;
- la etapa de incubación o etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura baja, particularmente comprendida entre alrededor de 2 y alrededor de 10 °C, en particular entre alrededor de 2 y alrededor de 8 °C, y dura alrededor de 1 h a alrededor de 72 h, en especial de alrededor de 6 a alrededor de 48 h, preferentemente de alrededor de 19 a alrededor de 30 h;
 - la etapa de incubación o etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura más alta comprendida entre alrededor de 20 y alrededor de 39 °C, particularmente a temperatura ambiente (25 °C ± 5 °C) y dura desde alrededor de 30 min a alrededor de 10 h, particularmente desde alrededor de 1 a alrededor de 6 h, preferentemente desde alrededor de 2 a alrededor de 4 h; es posible operar a una temperatura incluso superior a la temperatura ambiente, pero esto puede tener un impacto negativo en el rendimiento celular, P50 y/o el contenido de 2,3-DPG;
 - en la etapa de incubación o etapa (c), la suspensión se encuentra en un hematocrito inicial comprendido entre el 10 y el 85 %, particularmente entre el 40 y el 80 %; se puede incubar una pastilla de separación, que tiene, por ejemplo, un hematocrito entre 70 y alrededor del 85 %, o un sedimento diluido que tiene un hematocrito comprendido entre alrededor del 40 y el 70 %;
 - la etapa de incubación comprende agitar la suspensión;
 - la etapa de incubación no comprende ninguna agitación;
 - como solución para el lavado y/o la incubación, se utiliza una solución acuosa de NaCl medida para obtener la osmolalidad deseada; como ejemplo, una solución puede comprender, por consiguiente, 0,9 % de NaCl; esta solución también puede comprender, especialmente además de NaCl, glucosa, en especial glucosa monohidrato, fosfato monosódico dihidrato, fosfato disódico dodecahidrato; como ejemplo, una composición comprende: 0,9 % de NaCl, 0,2 % de glucosa monohidrato, 0,034 % de fosfato monosódico dihidrato, 0,2 % de fosfato disódico dodecahidrato;
 - el lavado en la etapa final o etapa (e) se lleva a cabo con la solución de conservación;
 - la osmolalidad de la solución (porción líquida) en la suspensión lista para usar o que se puede inyectar en el paciente comprende entre alrededor de 280 y alrededor de 380 mOsmol/kg, preferentemente entre alrededor de 290 y alrededor de 330 mOsmol/kg;
 - el hematocrito de la suspensión lista para usar o que puede inyectarse en el paciente es igual o superior al 35, 40 o 45 %;
 - todas las etapas para el lavado y la incubación se llevan a cabo con la solución de conservación;
 - la solución de lavado de la etapa (b) y/o la solución de lavado de la etapa (e) y la solución de conservación son de la misma composición y comprenden compuesto (s) que promueven la conservación de los eritrocitos;
 - la solución de conservación (y la solución o soluciones de lavado o las soluciones de incubación, si es necesario) es una solución acuosa que comprende NaCl, adenina y al menos un compuesto de entre glucosa, dextrosa y manitol;
 - la solución de conservación (y la solución o soluciones de lavado o incubación, si es necesario) comprende NaCl, adenina y dextrosa, preferentemente un medio AS3;
 - la solución de conservación (y la solución o soluciones de lavado o incubación, si es necesario) comprende NaCl, adenina, glucosa y manitol, preferentemente un medio de SAG-manitol o ADsol.

[0085] Los procedimientos comprenden especialmente la siguiente etapa:

- (a) encapsular un ingrediente activo dentro de los eritrocitos, que comprende el contacto con un medio hipotónico que permite la apertura de poros en la membrana de los eritrocitos, entablar el contacto con el ingrediente activo para permitir su entrada en los eritrocitos, resellar los eritrocitos por medio de un medio isotónico o hipertónico. Cabe señalar que el ingrediente activo puede estar presente en la suspensión de eritrocitos antes de la lisis de estos últimos, o añadirse adicionalmente durante la lisis o después de la lisis, pero siempre antes de volver a sellar.
- En una realización de esta etapa (a), el procedimiento comprende las siguientes subetapas:
- (a1) obtener una suspensión de eritrocitos a un hematocrito igual o superior al 60 o 65 %,
 - (a2) medir la fragilidad osmótica de los eritrocitos en esta suspensión,
 - (a3) un procedimiento para la lisis e internalización del ingrediente o ingredientes activos, que comprende la etapa de la suspensión de eritrocitos en un dispositivo de diálisis, en especial, un cartucho de diálisis, contra una solución de lisis, ajustar el flujo de la suspensión de eritrocitos o ajustar la velocidad de flujo de la solución de lisis o ajustar la osmolaridad de la solución de lisis, dependiendo de la fragilidad osmótica medida en (a2),
 - (a4) un procedimiento para volver a sellar los eritrocitos.

[0086] La solicitud describe un procedimiento de tratamiento terapéutico destinado a proporcionar a un paciente que lo necesita, una enzima PLP y su cofactor, en condiciones de buena biodisponibilidad, lo que significa que la enzima y su cofactor están disponibles entre sí y en una cantidad efectiva de modo que la enzima sea activa y eficiente en una aplicación terapéutica. Este procedimiento tiene como objetivo principal agotar o reducir la concentración plasmática o circulante y/o la concentración en un órgano de un sustrato de la enzima. Este procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición según la invención o el uso de un kit según la invención.

[0087] Según un primer subobjeto, la solicitud describe un procedimiento de tratamiento terapéutico que permite la disminución o la reducción de metionina plasmática o circulante en un paciente que lo necesita. Este procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición según la invención o el uso de un kit según la invención, que comprende metioninasa y su cofactor. El procedimiento es un procedimiento para

tratar el cáncer, en especial, un cáncer que comprende células tumorales auxotróficas para la metionina, especialmente, cáncer de mama, pulmón, colon, riñón, vejiga, melanoma y glioblastoma.

5 **[0088]** Según un segundo subobjeto, la solicitud describe un procedimiento de tratamiento terapéutico que permite la disminución o la reducción de la homocisteína plasmática, circulante o hepática en un paciente que lo necesita. Este procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición según la invención o el uso de un kit según la invención, que comprende metioninasa y su cofactor. El procedimiento es un procedimiento para tratar la homocistinuria y/o una hiperhomocisteinemia y/o patologías asociadas con hiperhomocisteinemia, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad del sistema nervioso central, una enfermedad del sistema ocular y/o una enfermedad del esqueleto.

15 **[0089]** Según un tercer subobjeto, la solicitud describe un procedimiento de tratamiento terapéutico que permite la disminución o la reducción de tirosina plasmática o circulante en un paciente que lo necesita. Este procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición según la invención o el uso de un kit según la invención, que comprende TPL y su cofactor. El procedimiento es un procedimiento para tratar un cáncer, en especial un cáncer que comprende células tumorales auxotróficas para la tirosina, especialmente melanomas.

20 **[0090]** Según un cuarto subobjeto, la solicitud describe un procedimiento de tratamiento terapéutico que permite la disminución o la reducción de la tirosina plasmática o circulante, y/o hepática, en un paciente que lo necesita. Este procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición según la invención o el uso de un kit según la invención, que comprende hTATasa y su cofactor. El procedimiento es un procedimiento para tratar una enfermedad rara relacionada con una deficiencia de esta enzima PLP, en especial, el síndrome de Richner-Hanhart (tirosinemia de tipo II).

25 **[0091]** Según un quinto subobjeto, la solicitud describe un procedimiento de tratamiento terapéutico que permite la disminución o la reducción de la homocisteína plasmática, circulante y/o hepática en un paciente que lo necesita. Este procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición según la invención o el uso de un kit según la invención, que comprende cistationina beta-sintasa y su cofactor. El procedimiento es un procedimiento para tratar la homocistinuria y/o hiperhomocisteinemia y/o patologías asociadas con hiperhomocisteinemia, tal como una enfermedad cardiovascular, una enfermedad del sistema nervioso central, una enfermedad del sistema ocular y/o una enfermedad del esqueleto.

35 **[0092]** La composición usada en estas aplicaciones terapéuticas puede comprender además el cofactor de esta enzima PLP, es decir, PLP, y/o un precursor de la misma, que puede ser un precursor no fosfato, tal como una forma no fosfato de vitamina B6, y/o un precursor fosfato, tal como fosfato de piridoxina (PNP). La composición también puede comprender PN quinasa, PNP oxidasa, un agente que inhibe la PLP-fosfatasa. De manera más general, el procedimiento de tratamiento puede comprender la administración de una composición o un kit como se describió anteriormente.

40 **[0093]** Uno administra al paciente, por mes de tratamiento, una o varias dosis, en especial una o dos, que representan de 50 a 300 ml de suspensión o composición con un hematocrito mayor o igual al 35, 40 o 45 %, en una o varias inyecciones. Se administran especialmente por inyección intravenosa o intraarterial, en especial, por perfusión.

45 **[0094]** Alternativamente, una cantidad efectiva de una composición que comprende eritrocitos que encapsulan la enzima PLP, por ejemplo, metioninasa, y una cantidad efectiva de una solución que contiene una forma no fosfatada de vitamina B6, preferentemente PN, se administran por separado al mismo paciente. Esta forma no fosfatada de vitamina B6 puede administrarse por inyección, ya sea de manera simultánea o por separado con la suspensión de eritrocitos o por cualquier otra vía, especialmente por vía oral.

50 **[0095]** En una primera realización, una suspensión de eritrocitos que encapsula el ingrediente o los ingredientes activos, preparada dentro de 1 y 72 h, especialmente durante entre 10 y 72 h antes de la inyección al paciente. Esta suspensión tiene un hematocrito igual o superior al 35, 40 o 45 %. Se encuentra en una solución de conservación. El nivel de hemoglobina extracelular es igual o menor que 0,5, en particular 0,3, especialmente 0,2, preferentemente 55 0,15, aún mejor, de 0,1 g/dl, y/o el nivel de hemólisis es igual o menor del 2, especialmente del 1,5 y preferentemente del 1 %. La suspensión no se lava ni se somete a una operación similar antes de la inyección.

60 **[0096]** La solicitud describe además un procedimiento para producir metioninasa, en forma purificada y con alto rendimiento, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar bacterias transformadas para producir metioninasa, centrifugar el cultivo y recuperar la pastilla,
- (b) suspender el precipitado en un amortiguador de lisis y lisar las células bacterianas, centrifugar y recuperar el sobrenadante,
- (c) tratar el sobrenadante con un agente precipitante, precipitar y recuperar el precipitado,
- 65 (d) aplicar al sedimento dos rondas de cristalización o precipitación utilizando PEG a una temperatura comprendida

entre aproximadamente 25 y 40 °C, recuperando la pastilla,

(e) suspender la pastilla en un amortiguador de solubilización (por ejemplo, [Tris 25 mM; 0,5 mM de P5P; 0,5 mg/ml de beta mercapto etanol; pH 7,5]) y someterse a dos rondas de cromatografía de intercambio aniónico, recuperando una solución de metioninFasa,

- 5 (f) someter la solución de metioninasa a una etapa de pulido mediante cromatografía, recuperación de una solución de metioninasa purificada.

[0097] En una realización preferida, se hace uso de la secuencia codificante de metioninasa de *Pseudomas putida*. Esta secuencia puede optimizarse para adaptar la secuencia a la cepa de producción. La cepa de producción es preferentemente E. coli, tal como la cepa HMS174. Se utiliza un vector de expresión que contiene la secuencia de metioninasa, preferentemente la optimizada, para transformar la cepa productora, y se puede seleccionar un clon productor. A continuación, la producción de metioninasa utilizando este clon se realiza en un fermentador en las condiciones habituales.

- 15 **[0098]** Preferentemente, la pastilla de la etapa (a) se resuspende en el amortiguador de lisis (por ejemplo, [fosfato de sodio 100 mM; 4,4 mM de EDTA 3,3 mM de P5P 1 mM de DTT pH 7,6]) (7 mL por gramo de peso húmedo). Preferentemente, la lisis se realiza mediante homogeneización de alta presión, ventajosamente en varias etapas, preferentemente 3 etapas de homogeneización de alta presión. La temperatura típica se mantiene a alrededor de 10 °C antes de cada etapa de homogeneización (entre 9 y 12 °C). Preferentemente, después de la lisis y antes de la
20 centrifugación, el lisado celular se somete a clarificación usando un coagulante catiónico, preferentemente polietilenimina (PEI). La concentración típica de PEI puede estar entre alrededor de 0,05 y alrededor de 0,5 % (V/V), en particular entre alrededor del 0,1 y alrededor del 0,3 % preferentemente alrededor del 0,2 %.

- [0099]** La precipitación en la etapa (c) se puede realizar con sulfato de amonio, típicamente a alrededor del
25 60 % de saturación. Preferentemente, antes de esta precipitación, el sobrenadante se filtra en una membrana de aproximadamente 0,2 µm.

- [0100]** En la etapa (d), el PEG es preferentemente PEG-6000. Su concentración final puede estar entre
alrededor del 5 y alrededor del 25 % (W/V), en particular entre alrededor del 5 y alrededor del 15 %. La primera ronda
30 puede realizarse preferentemente en presencia de sulfato de amonio. Típicamente, el sulfato de amonio puede estar en alrededor del 10 % de saturación (entre el 9 y el 11 %). Típicamente, el PEG puede estar a una concentración final de alrededor de 10 %. La segunda ronda puede realizarse preferentemente en presencia de una sal inorgánica, típicamente una sal de metal alcalino tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio, preferentemente, cloruro de sodio. La sal puede estar a una concentración final de alrededor de 0,20 M (entre 0,19 y 0,21). Típicamente, el PEG puede
35 estar en aproximadamente el 12 % de la concentración final. La temperatura puede comprender entre alrededor de 25 y alrededor de 35 °C, en particular, entre alrededor de 28 y alrededor de 32 °C, típicamente alrededor de 30 °C.

- [0101]** En la etapa (e) se puede realizar una cromatografía de DEAE sefarosa. Preferentemente, antes de la
40 cromatografía, la pastilla o sedimento resuspendido puede someterse a pasaje a través de un filtro de alrededor de 0,45 µm.

[0102] En la etapa (f), se realiza el pulido para eliminar los contaminantes residuales restantes, tales como endotoxinas, HCP y ADN. Se puede realizar utilizando una cromatografía de membrana Q.

- 45 **[0103]** La metioninasa purificada, a continuación, puede concentrarse y diafiltrarse. La conservación se puede realizar mediante liofilización y almacenamiento a alrededor de -80 °C. La invención se describirá ahora con más detalle mediante realizaciones tomadas como ejemplos no taxativos y con referencia al dibujo, donde:

Fig. 1: Descripción del procedimiento para purificar MGL, según el procedimiento descrito en el documento EP 0 978 560 y según el procedimiento mejorado que se describe en la presente solicitud. Las modificaciones aportadas al procedimiento descrito en la patente EP 0 978 560 B1 se refieren a las etapas ubicadas después de la etapa de precipitación con sulfato de amonio.

Fig. 2 y 3. Comparación de las concentraciones intraeritrocitarias (fig. 2) y extracelulares (fig. 3) de PLP después de la incubación de una suspensión RC-MGL-PLP con piridoxina (PN) en diferentes concentraciones. La suspensión RC-MGL-PLP, incubada durante 3 y 24 h a temperatura ambiente en ausencia de piridoxina (0 µM) tiene un nivel de PLP basal de aproximadamente 3,9 µM. La incubación de las suspensiones con 2 µM y 4 µM de piridoxina da la posibilidad de aumentar la concentración de PLP intraeritrocitario a 8 µM después de 3 h de incubación (barras grises pálidas) y da la posibilidad de alcanzar niveles considerablemente más altos (11 µM y 14 µM respectivamente) después de 24 h de incubación (barras grises oscuras).

Fig. 4. Farmacocinética de glóbulos rojos (RC) cargados con un complejo MGL-PLP. El producto RC-MGL-PLP2 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~30 µM de PLP. El producto RC-MGL-PLP3 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~125 µM de PLP. El producto RC- MGL-PLP4 se obtiene mediante el sellado por lisis de una suspensión que contiene 5 mg/ml de MGL y 33 µM de PLP. El producto RC-MGL-PLP5 se obtiene mediante resellado por lisis de
65 una suspensión que contiene 6 mg/ml de MGL y 100 µM de PLP. El etiquetado fluorescente de los productos

(CFSE) permite la trazabilidad de los RC *in vivo*. Los productos inyectados por vía intravenosa a los ratones CD1 (8 ml/kg para los productos RC-MGL-PLP2, RC-MGL-PLP3 y RC-MGL-PLP5 y 10 ml/kg para el producto RC-MGL-PLP4) tienen una excelente estabilidad con una tasa de supervivencia de los RC inyectados superior al 75 % a las 120 h, es decir, 5 días después de su administración. Para el producto RC-MGL-PLP4, la tasa de supervivencia se reduce a menos del 75 % después de ~10 días.

Fig. 5. Farmacodinámica de la enzima MGL libre. La enzima MGL se diluyó mediante una solución de fosfato de potasio complementada con 10 μ M de P5P para obtener dos productos inyectables (MGL-L1 y MGL-L2). Estos productos se fabricaron para obtener 1) la misma concentración enzimática que el producto RC-MGL-PLP2, es decir, 0,45 mg/ml de MGL y 2) una concentración dos veces mayor que el producto RC-MGL-PLP2, es decir, 0,90 mg/ml de MGL. Ambos productos se administran por vía intravenosa (IV) a ratones CD1 (8 ml/kg) y son complementados por vía IV con piridoxina 6 h después de la inyección. El nivel plasmático de L-metionina se mide mediante HPLC-MS-MS. Se evaluó que el nivel de L-Met en CD1 no tratados era de 68 μ M. Estos productos MGL-L1 y MGL-L2 conducen a una disminución rápida dentro de los 15 minutos posteriores a su administración, pero no duran mucho tiempo.

Fig. 6. Farmacodinámica de los RC-MGL-PLP durante períodos cortos. El producto RC-MGL-PLP2 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~30 μ M de PLP. El producto RC-MGL-PLP3 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~125 μ M de PLP. Ambos productos se administran por vía intravenosa (IV) a ratones CD1 (8 ml/kg) con complemento IV de piridoxina 6 h después de la administración para los ratones que reciben RC-MGL-PLP2. El nivel plasmático de L-metionina se mide mediante HPLC-MS-MS. Se evaluó que el nivel de L-Met en CD1 no tratados era de 82 μ M. Ambos productos RC-MGL-PLP2 y RC-MGL-PLP3 conducen a una disminución rápida 15 minutos después de su administración, reduciendo el nivel de L-Met a 15,0 \pm 3,6 μ M y 22,7 \pm 1,5 μ M respectivamente y, a continuación, manteniendo una disminución más moderada a 35 μ M, pero estable entre 48 y 120 h.

Fig. 7. Farmacodinámica de los RC-MGL-PLP durante largos períodos. El producto RC-MGL-PLP4 (0,5 mg/ml) se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 5 mg/ml de MGL y 33 μ M de PLP. El producto se administra por vía intravenosa (IV) a ratones CD1 (10 ml/kg) con complemento IV de piridoxina 6 h después de la administración para los ratones que reciben RC-MGL-PLP4. El nivel plasmático de L-metionina se mide mediante HPLC-MS-MS. Se evaluó que el nivel de L-Met en CD1 no tratados era de 68 μ M. El producto RC-MGL-PLP4 conduce a una disminución rápida 15 min después de la administración, reduciendo el nivel de L-Met a ~10 μ M y, a continuación, manteniendo una disminución más moderada a ~25 μ M, pero estable entre 24 y 48 h para, a continuación, regresar gradualmente a los valores de control 12 días después de la inyección.

Fig. 8. Actividad residual de las enzimas PLP circulantes. La enzima MGL se diluyó mediante una solución de fosfato de potasio complementada con 10 μ M de P5P para obtener el producto inyectable MGL-L2. El producto RC-MGL-PLP2 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~30 μ M de PLP. El producto RC-MGL-PLP3 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~125 μ M de PLP. El producto RC-MGL-PLP4 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 5 mg/ml de MGL y 33 μ M de PLP. El producto RC-MGL-PLP5 se obtiene mediante resellado por lisis de una suspensión que contiene 6 mg/ml de MGL y 100 μ M de PLP. Los productos se inyectan por vía intravenosa en ratones CD1 (8 ml/kg para los productos MGL-L2, RC-MGL-PLP2, RC-MGL-PLP3 y RC-MGL-PLP5, y 10 ml/kg para el producto RC-MGL-PLP4). La actividad residual de la enzima MGL inyectada (RC totales) se determina mediante una medición del NH₃ producido por MGL según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

Ejemplo 1. Procedimiento de obtención y caracterización de la metionina gamma liasa (MGL)

[0104] Producción de la cepa y aislamiento de un clon hiperproductor: se optimizó la secuencia natural de MGL de *Pseudomonas putida* (GenBank: D88554.1) mediante la modificación de codones raros (con el fin de adaptar la secuencia derivada de *P. putida* a la cepa de producción *Escherichia coli*). Se han introducido otros cambios para mejorar el contexto de la iniciación de la traducción. Finalmente, se realizaron mutaciones silenciosas para eliminar tres elementos que forman parte de un promotor bacteriano putativo en la secuencia codificante (recuadro -35, recuadro -10 y un sitio de unión de un factor de transcripción en la posición 56). La cepa de producción *E. coli* HMS174 (DE3) se transformó con el vector de expresión pGTPc502_MGL (promotor T7) que contenía la secuencia optimizada y se seleccionó un clon productor. El clon productor se cultiva previamente en un medio GY + 0,5 % de glucosa + kanamicina durante 6 a 8 h (precultivo 1) y 16 h (precultivo 2) a 37 °C.

[0105] Fermentación: la producción se logra, a continuación, en un fermentador con medio GY, con agitación, presión controlada y pH del precultivo 2 a una densidad óptica de 0,02. La fase de crecimiento (a 37 °C) tiene lugar hasta que se obtiene una densidad óptica de 10 y la inducción de expresión se logra a 28 °C mediante la adición de IPTG 1 mM en el medio de cultivo. La pastilla celular se cosecha 20 h después de la inducción en dos fases: el caldo celular se concentra 5-10 veces después de pasar sobre una fibra hueca de 500 kDa y, a continuación, la pastilla celular se recupera mediante centrifugación a 15900 x g and y, a continuación, se almacena a -20 °C.

[0106] Purificación: La pastilla celular se descongela y se suspende en el amortiguador de lisis (7 v/v). La lisis se realiza a 10 °C en tres etapas mediante homogeneización de alta presión (una etapa a 1000 bares, y, a continuación, dos etapas a 600 bares). El lisado celular, a continuación, se somete a clarificación a 10 °C mediante la

adición de PEI al 0,2 % y centrifugación a 15900 x g. La fracción soluble se esteriliza, a continuación, 0,2 µm antes de la precipitación con sulfato de amonio (60 % de saturación) a 6 °C, durante 20 h. Se llevan a cabo dos etapas de cristalización en la pastilla resolubilizada usando un amortiguador de solubilización, la primera etapa de cristalización se lleva a cabo mediante la adición de PEG-6000 al 10 % (concentración final) y sulfato de amonio al 10 % de saturación, y la segunda cristalización se lleva a cabo mediante la adición de PEG-6000 al 12 % de concentración final y NaCl 0,2 M (concentración final) a 30 °C. Los gránulos que contienen la proteína MGL se cosechan en cada etapa después de la centrifugación a 15900 x g. El sedimento que contiene la proteína MGL se vuelve a suspender en un amortiguador de solubilización y se pasa sobre un filtro de 0,45 m antes de someterse a dos cromatografías de intercambio aniónico (DEAE sefarosa FF). La proteína purificada, a continuación, se somete a una etapa de pulido y se pasa sobre una cápsula de cromatografía de membrana Q para eliminar los diferentes contaminantes (endotoxinas, proteína de célula hospedadora HCP, ADN residual). Finalmente, la proteína MGL purificada se concentra a 40 mg/ml y se diafiltra en un amortiguador de formulación usando un casete de filtración de flujo tangencial de corte de 10 kDa. A continuación, la sustancia se alicuota a ~ 50 mg de proteína por vial, finalmente se liofiliza a presión y temperatura controladas y se almacena a -80 °C.

[0107] Caracterización: La actividad específica de la enzima se determina midiendo el NH₃ producido, como se describe en el ejemplo 4. La pureza se determina mediante SDS-PAGE. El nivel de PLP después de ser absorbido en agua se evaluó según el procedimiento descrito en el ejemplo 5. La osmolaridad se mide con un osmómetro (Microosmómetro

tipo Löser 15).

[0108] La siguiente tabla resume las principales características de un lote de MGL producido:

	MGL de <i>P. putida</i>
Formulación	Liofilizada (cantidad por tubo: 49,2 mg). <i>Características tras su absorción en 625 µL de agua:</i> 78,7 mg/ml, ~ 622 µM de PLP, 50 mM de fosfato de Na, pH 7,2, osmolaridad de 300 mOsmol/kg.
Actividad específica	13,2 UI/mg
Pureza	>98 %

25

[0109] Discusión del procedimiento de producción. El procedimiento para purificar la MGL descrito en el Ejemplo 1 se establece sobre la base del procedimiento detallado en la patente EP 0 978 560 B1 y de la publicación asociada (Takakura y col., Appl Microbiol Biotechnol 2006). Esta selección se explica por la simplicidad y la robustez de la etapa de cristalización que se describe como particularmente práctica y fácilmente adaptable a producciones a gran escala, según los autores. Esta etapa se basa en el uso de PEG6000 y de sulfato de amonio después de calentar la solución de MGL obtenida después de la lisis/clarificación eliminación de impurezas mediante la adición de PEG6000/etapas de sulfato de amonio. El otro punto notable de esta etapa es la posibilidad de obtener rápidamente un alto nivel de pureza durante la etapa para eliminar las impurezas, logrando la centrifugación después del tratamiento de la solución de MGL con PEG6000. Las impurezas se encuentran nuevamente en la pastilla de centrifugación, la MGL se encuentra mayoritariamente en solución en el sobrenadante. Debido a esta pureza, el paso de la solución de MGL en una sola etapa de cromatografía sobre una columna intercambiadora de aniones (DEAE), asociada a una etapa de purificación mediante filtración en gel en una columna Sefacril S200 HR, da la posibilidad de obtener una proteína purificada.

40

[0110] Al establecer el procedimiento patentado para las pruebas a pequeña escala, pareció no haber sido posible reproducir los resultados obtenidos. Según la patente EP 0 978 560 B1, al final de la etapa para eliminar las impurezas (tratamiento con PEG6000/sulfato de amonio y centrifugación), la enzima MGL se encuentra en su mayoría en la fracción soluble, centrifugación que provoca la eliminación de las impurezas en la pastilla. Durante las pruebas a pequeña escala realizadas según el procedimiento descrito en el documento EP 0 978 560 B1, la proteína MGL se encuentra de nuevo mayoritariamente (~80 %) en la pastilla de centrifugación. La tabla a continuación enumera el porcentaje de MGL evaluado por densitometría en gel SDS-PAGE en fracciones solubles.

45

Purificación	Porcentaje de MGL en la fracción soluble	Media
Prueba No. 1:	11 %	17 %
Prueba No. 2:	23 %	

[0111] Por lo tanto, este resultado inesperado llevó a la optimización del procedimiento patentado al: 1) operar

50

desde la pastilla de centrifugación que contiene MGL, 2) llevar a cabo dos etapas sucesivas de cristalización para mejorar la eliminación de las impurezas después de la carga en una columna DEAE, 3) optimizar la cromatografía en una columna DEAE.

5 **[0112]** Para esta última etapa, se encuentra que la resina DEAE sefarosa FF finalmente no es un intercambiador suficientemente fuerte en las condiciones probadas del amortiguador y el pH. Después de diferentes pruebas de optimización adicionales, la selección finalmente se dirigió a 1) reemplazar el amortiguador de fosfato utilizado en el procedimiento inicial con amortiguador Tris de pH 7,6 para mejorar la robustez del procedimiento y 2) llevar a cabo un segundo pasaje en DEAE para mejorar sustancialmente el nivel de endotoxina y la pureza de la proteína sin ninguna pérdida de MGL (0,8 EU/mg según Takakura y col., 2006 *versus* a 0,57 EU/mg para el procedimiento modificado).

15 **[0113]** Finalmente, con el fin de obtener un procedimiento compatible con los requisitos para la producción de GMP a gran escala, se añadió una etapa *de pulido* en una membrana Q para reducir los niveles residuales de endotoxinas y HCP. Esta etapa final de pulido evita la implementación de la cromatografía de filtración en gel S200 que es una etapa difícil de utilizar en los procedimientos de producción a escala industrial (coste y duración de la cromatografía).

20 **[0114]** Las diferentes etapas de purificación del procedimiento del documento EP 0 978 560 B1, así como también del procedimiento de la presente solicitud se dan en la figura 1.

[0115] El siguiente cuadro ofrece la posibilidad de comprobar que las adaptaciones aportadas han permitido obtener un procedimiento de purificación con un rendimiento al menos equivalente al descrito en el procedimiento inicial.

Etapa	Patente EP 978 560 B1		Procedimiento de la solicitud	
	Cantidad de enzima (g)	Rendimiento (%)	Cantidad de enzima (g)	Rendimiento (%)
Pastilla solubilizada antes de DEAE	125	100	70	100
Solución concentrada [§]	80	64	46	65

§ después de Sefacril S-200 HR (EP 978 560) o después de la Membrana Q (procedimiento de la invención).

25

Ejemplo 2. Coencapsulación de MGL y PLP en eritrocitos murinos.

30 **[0116]** La sangre entera de ratones CD1 (Charles River) se centrifuga a 1000 x g, durante 10 min, a 4 °C para eliminar el plasma y la capa de espuma. Los RC se lavan tres veces con NaCl al 0,9 % (v:v). La MGL liofilizada se vuelve a suspender en agua a una concentración de 78,7 mg/ml y se añade a la suspensión de eritrocitos para obtener una suspensión final con un hematocrito del 70 %, que contiene diferentes concentraciones de MGL y del PLP. A continuación, se cargó la suspensión en un hemodializador a una velocidad de flujo de 120 ml/h y se dializó contra una solución hipotónica a una velocidad de flujo de 15 ml/min como contracorriente. La suspensión se volvió a cerrar con una solución hipertónica y, a continuación, se incubó durante 30 min a 37 °C. Después de tres lavados en NaCl al 0,9 %, glucosa al 0,2 %, la suspensión se absorbió en una solución de conservación SAG-manitol complementada con BSA al 6 %. Los productos obtenidos se caracterizan en D0 (dentro de las 2 h siguientes a su preparación) y en D1 (es decir, después de ~ 18 a 24 h de conservación a 2-8 °C). Las características hematológicas se obtienen con un autómata veterinario (Sysmex, Poch-100iV).

40

Resultados:

45 **[0117]** En los diferentes estudios mencionados a continuación, la actividad de MGL en los productos terminados se evalúa con el procedimiento descrito en el ejemplo 4 contra un intervalo de calibración externo de MGL en solución acuosa. Estos resultados, combinados con estudios explicativos, muestran que la actividad de MGL en los productos terminados aumenta con la cantidad de enzima introducida en el procedimiento y que es fácil encapsular hasta 32 UI de MGL por ml de producto terminado manteniendo al mismo tiempo una buena estabilidad.

50 **[0118]** En otro estudio, se prepararon tres productos terminados murinos RC-MGL-PLP1, RC-MGL-PLP2 y RC-MGL-PLP3 según los siguientes procedimientos:

- RC-MGL-PLP1: coencapsulación de MGL y de PLP de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~30 µM de PLP. El producto final se absorbió en SAG-Manitol, BSA al 6 % complementado con PLP final de 10 µM.

55 - RC-MGL-PLP2: coencapsulación de MGL y de PLP de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~30 µM de PLP. El producto terminado se absorbió en SAG-Manitol 6 % BSA.

- RC-MGL-PLP3: este producto deriva de una coencapsulación de MGL y PLP de una suspensión que contiene 3 mg/ml de MGL y ~124 mM de PLP. El producto final se absorbió en SAG-Manitol 6 % BSA.

5 [0119] En un tercer estudio, se preparó un producto terminado murino RC-MGL-PLP4 a partir de un nuevo lote de MGL según los siguientes procedimientos:

- RC-MGL-PLP4: coencapsulación de MGL y el PLP de una suspensión que contiene 5 mg/ml de MGL y ~35 µM de PLP. El producto terminado se absorbió en SAG-Manitol 6 % BSA.

10

[0120] Finalmente, en un cuarto estudio, se preparó un producto terminado murino RC-MGL-PLP5 a partir de un tercer lote de MGL según los siguientes procedimientos:

15 - RC-MGL-PLP5: coencapsulación de MGL y PLP de una suspensión que contiene 6 mg/ml de MGL y ~100 µM de PLP. El producto terminado se absorbió en SAG-Manitol 6 % BSA.

[0121] Las características hematológicas y bioquímicas de los tres productos terminados en D0 (después de su preparación) se detallan en la tabla a continuación. Los rendimientos de encapsulación son satisfactorios y varían del 18,6 al 30,5 %.

20

		RC-MGL-PLP1	RC-MGL-PLP2	RC-MGL-PLP3	RC-MGL-PLP4	RC-MGL-PLP5
Datos hematológicos	Hematocrito (%)	50,0	49,6	50,0	50,0	50,0
	Volumen corpuscular (fl)	46,3	46,5	46,8	42,4	45,6
	Hemoglobina corpuscular (g/dl)	24,7	24,0	24,2	27,4	25,1
	Concentración de RC (10 ⁶ /ml)	6,5	6,9	6,6	7,2	6,0
	Hemoglobina total (g/dl)	14,8	15,4	15,0	16,6	13,8
	Hb extracelular (g/dl)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,05
mgl	Concentración intraeritrocitaria de MGL (mg/ml de RC)	0,97	0,94	0,79	1,01	1,36
	Actividad intraeritrocitaria de MGL (UI/ml de RC)*	12,8	12,4	8,8	5,0	8,6
	Actividad extracelular (%)	0,92 %	0,97 %	1,32 %	1,18 %	2,23 %
	Actividad intracelular (%)	99,08 %	99,03 %	98,68 %	98,82 %	97,77 %
	Rendimiento de encapsulación de MGL (%)	18,6 %	30,5 %	22,6 %	19,4 %	22,7 %
PLP	Concentración intraeritrocitaria de PLP (µmol/l de RC)	ND	13,4	71,4	10,2	ND
	Fracción de PLP intracelular (%)	ND	99,5	98,7	98,1	ND
	Fracción PLP extracelular (%)	ND	0,5	1,3	1,92	ND
	Rendimiento de encapsulación PLP (%)	ND	44,8	57,4	30,7	ND
*Calculado a partir de la actividad específica de cada lote.						

Ejemplo 3. Producción de RC humanos que encapsulan metionina gamma liasa y PLP según el procedimiento industrial

25 [0122] Una bolsa de RC humanos agotados por leucocitos (proporcionada por el "Etablissement Franpais du Sang") está sujeta a un ciclo de tres lavados con NaCl al 0,9 % (lavadora Cobe 2991). La MGL liofilizado se vuelve a

suspender con NaCl al 0,7 % y se añade a la suspensión de eritrocitos para obtener una suspensión final con un hematocrito del 70 %, que contiene 3 mg/ml de MGL y ~30 μ M de PLP (derivado de la formulación de MGL). La suspensión se homogeneiza y se procede a la encapsulación según el procedimiento descrito en el documento EP 1 773 452. A continuación, se incuba la suspensión del sellado durante 3 h a temperatura ambiente para eliminar los RC más frágiles. La suspensión se lava tres veces con una solución de NaCl al 0,9 %, glucosa al 0,2 % (lavadora Cobe 2991) y, a continuación, se vuelve a suspender con 80 ml de solución de conservación (AS-3). El nivel de MGL encapsulada se evalúa como en el Ejemplo 4.

	J0	J1	J7
Hematocrito (%)	52,0	51,6	52,7
Volumen corpuscular (fl)	91,0	92,0	88,0
Hemoglobina corpuscular (g/dl)	30,3	29,8	31,6
Concentración de RC ($10^6/\mu$ l)	6,00	5,92	5,98
Hemoglobina total (g/dl)	16,4	16,2	16,6
Hb extracelular (g/dl)	0,119	0,197	0,280
Fragilidad osmótica (g/l)	1,17		
Hemólisis (%)	0,7 %	1,2 %	1,7 %
Concentración total de MGL (mg/ml)	0,36	0,35	
Concentración de sobrenadante de MGL (mg/ml)	0,01	0,01	
Concentración intraeritrocitaria de MGL (mg/ml, 100 % de Ht)	0,68	0,67	
Actividad extracelular (%)	1,3 %	1,4 %	
Actividad intracelular (%)	98,7 %	98,6 %	
Rendimiento de encapsulación (%)	19,7 %		

10 **Ejemplo 4. Ensayo de MGL encapsulada en los RC**

[0123] El ensayo de la actividad de MGL en suspensiones celulares (RC totales) y en los sobrenadantes se basa en una medición de NH_3 producida por MGL. Los iones de NH_3 se analizan indirectamente mediante la acción enzimática de glutamato deshidrogenasa (GLDH) según el kit comercializado por Roche Diagnostics (11877984).

15

[0124] *Preparación de los estándares:* los estándares de MGL en diferentes concentraciones se prepararon en matrices (RC totales o sobrenadantes) o en una solución acuosa.

> Para los estándares en una solución acuosa, se prepara MGL en concentraciones que varían de 0 a 12 μ g/ml en presencia de PLP 20 μ M en un amortiguador de fosfato 100 mM, a un pH de 7,2.

> Para los estándares matriciales de RC totales, se lisan 10 μ l de RC-LR con 90 μ l de una solución que contiene 260 μ M de PLP y de MGL en concentraciones que varían de 0 a 100 mg/ml. Los estándares de "RC total" se diluyen, a continuación, 20 veces con amortiguador de fosfato 100 μ M, pH 7,2.

> Para los estándares matriciales de sobrenadantes, se lisan 10 μ l de sobrenadantes de RC-LR con 50 μ l de una solución que contiene 6,4 μ M de PLP y de MGL en concentraciones que varían de 0 a 20 mg/ml.

25

[0125] *Tratamiento previo de las muestras:* las muestras que deben evaluarse (10 ml) se tratan previamente de la misma manera que los estándares (adición de PLP y diluciones idénticas, pero sin la adición de MGL).

[0126] *Ensayo de MGL:* 7,5 μ l de estándares (STD) o de muestras se introducen en los pocillos de una placa UV. Se añaden 94 μ l de reactivo R1 (kit Roche) y 56 μ l de reactivo R2 (kit Roche) que contiene α -cetoglutarato en una solución amortiguadora, NADPH y GLDH para eliminar los iones NH_3 endógenos de las muestras. Después de 10 min de incubación, se introducen 75 μ l de L-metionina a 78,3 mM y se incuban las mezclas de reacción durante 30 min. La degradación de NADPH en NADP^+ se rastrea continuamente midiendo la densidad óptica a 340 nm. Para los estándares y las muestras, se calcula el valor de $\Delta\text{OD}/\text{min}$ sobre el dominio lineal de las curvas O.D. obtenidas a 340 nm. A continuación, se grafica una curva de calibración $\Delta\text{OD}/\text{min} = f$ (concentración o actividad de MGL en los estándares). Los parámetros de regresión permiten determinar la concentración de MGL en las muestras. Este resultado puede expresarse en mg/ml o en UI/ml (la actividad específica de MGL que se evalúa para cada lote). El nivel de MGL intraeritrocitario se obtiene mediante un cálculo con la siguiente fórmula: $[\text{MGL}]_{\text{intraeritrocito}} =$

30

35

$([MGL]_{total} - ([MGL]_{sobrenadantes} \times (1 - \text{hematocrito}/100))) / (\text{hematocrito}/100)$.

Ejemplo 5. Ensayo de PLP en muestras de sangre mediante un procedimiento de HPLC

5 **[0127]** El ensayo de PLP en suspensiones celulares (RC totales) y en los sobrenadantes es una adaptación del procedimiento descrito por Van de Kamp y col. Nutrition Research 15, 415-422, 1995. El ensayo se lleva a cabo con RP-HPLC (Shimadzu UFLC) con detección por fluorimetría (instrumento RF-10AXL, excitación: 300 nm, emisión: 400 nm). El PLP contenido en las muestras se extrae con ácido tricloroacético (TCA) en un 6 % final. Después de la centrifugación (15.000 x g, 10 min), se recogen los sobrenadantes y, a continuación, se diluyen en una fase móvil A. 10 Se inyecta un volumen de muestra de 50 µl en una columna Géminis C-18 de 5 m, 250 x 4,6 mm (Phenomenex). La fase móvil A consta de 33 mM de fosfato potásico monobásico, de 8 mM de 1-octanosulfonato sódico complementado con bisulfito sódico (0,5 g/l) para intensificar la señal del PLP y de la fase móvil B, de 33 mM de fosfato potásico monobásico y de 17 % (v:v) de 2-propanol. El gradiente utilizado es la fase móvil A (100 %) con proporciones crecientes de fase móvil B: un aumento del 0 al 8 % de B en un período de 8 min. El flujo a través de la columna se mantiene a 1 ml/min. La concentración de PLP en las muestras se determina con un intervalo estándar externo de PLP sujeto al mismo tratamiento de TCA que las muestras. El tiempo de retención del PLP es de ~3,4 min. El nivel de PLP intraeritrocitario se obtiene mediante el cálculo con la siguiente fórmula: $[PLP]_{intraeritrocito} = ([PLP]_{total} - ([PLP]_{sobrenadantes} \times (1 - \text{hematocrito}/100))) / (\text{hematocrito}/100)$.

20 **Ejemplo 6. Aumento del nivel de PLP en RC mediante la coencapsulación de PLP con MGL**

[0128] Las suspensiones de RC murinos están sujetas al procedimiento para encapsular MGL y PLP como se describe en el Ejemplo 2. **El ensayo del PLP intracelular se lleva a cabo según el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.**

25 **[0129]** Una suspensión de RC humanos está sujeta al procedimiento para encapsular MGL y PLP, tal como se describe en el Ejemplo 3. Antes de la etapa de incubación a temperatura ambiente, se toma una muestra de RC-MGL-PLP humanos para llevar a cabo un ensayo del PLP intracelular según el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

30 **[0130]** La siguiente tabla compara los niveles fisiológicos de PLP en eritrocitos humanos o murinos con el nivel alcanzado por la coencapsulación de este último con MGL.

	RC humanos	RC murinos
Nivel fisiológico de PLP	0,11 µM (Natta y Reynolds)	~ 2,4 µM* (Fonda)
Nivel de PLP en RC-MGL-PLP1 o RC-MGL-PLP2	Condiciones previas a la diálisis: • 3 mg/ml de MGL • ~ 30 µM de PLP ~ 3,90 µM	~ 13,4 µM
Nivel de PLP en RC-MGL-PLP3	Condiciones previas a la diálisis: • 3 mg/ml de MGL • ~ 125 µM de PLP	~ 71,4 µM

* detalle del cálculo: 7,5 nmol/g Hb ~ 2,4 µM (suponiendo una CCMH de 32 g/dl).

35 **Ejemplo 7. Demostración del aumento de la concentración de PLP en RC-MGL por incubación *in vitro* con piridoxina.**

[0131] Una suspensión de RC humanos está sujeta al procedimiento para encapsular MGL tal como se describe en el Ejemplo 3. Antes de la etapa de incubación de 3 h, se toma una porción de los RC y se separa en tres para una incubación volumétrica con piridoxina en diferentes concentraciones (0 mM, 2 mM y 4 mM). Después de la homogeneización, estas suspensiones se incuban a temperatura ambiente (RT). Después de 3 y 24 h de incubación, las muestras de las suspensiones celulares y de los sobrenadantes (obtenidas después de la centrifugación de las suspensiones a 1000 x g, a 4 °C, durante 10 min) se preparan y congelan para una medición de la concentración de PLP mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 5.

45 **[0132]** Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 2 y 3.

[0133] En ausencia de piridoxina, el nivel de PLP intraeritrocitario es de 3,9 µM (PLP derivado de la

coencapsulación de MGL y PLP). Esta concentración de PLP permanece constante después de 3 y 24 h de incubación. Se observa una ligera disminución en la concentración de PLP a las 24 h y es concomitante con la aparición de PLP extracelular que puede explicarse por hemólisis al final de la incubación.

5 **[0134]** En presencia de piridoxina (a 2 mM o a 4 mM), los RC-MGL se enriquecen en PLP con concentraciones intraeritrocitarias aumentadas en un factor 2 después de 3 h de incubación (~8 µM de PLP) y en casi un factor 3 después de 24 h de incubación con la aparición de un efecto de dosis (11 µM y 14 µM para concentraciones respectivas de piridoxina de 2 mM y 4 mM). Estos resultados muestran que una incubación de una suspensión de RC que encapsula una enzima PLP dependiente de PLP con piridoxina (PN) es capaz de aumentar el nivel de PLP intracelular
10 de una manera duradera.

Ejemplo 8. Farmacocinética de RC que encapsulan MGL-PLP en ratones.

[0135] Los productos murinos RC-MGL-PLP2, RC-MGL-PLP3, RC-MGL-PLP4 y RC-MGL-PLP5 se etiquetan con CFSE (fluorescente) y se inyectan por vía intravenosa en ratones CD1. Después de varias veces (D0 + 15 min, D1, D2, D5, para los tres productos con adicionalmente D14 y D28 para el RC-MGL-PLP4 y D14 para el producto RC-MGL-PLP5), los ratones se sacrifican y la sangre se recoge en un tubo de heparinato de litio mantenido a +4 °C de distancia de la luz a fin de determinar la farmacocinética. La proporción de glóbulos rojos marcados con CFSE en toda la sangre se determina mediante un procedimiento de citometría de flujo. Se diluyen cinco microlitros de sangre entera
20 en 1 ml de PBS 0,5 % BSA y se pasa cada muestra por triplicado (conteo de 10.000 células en FL-1; citómetro FC500, Beckman Coulter). La evaluación de la supervivencia de los glóbulos rojos cargados con MGL se obtiene mediante la adición de la proporción de RC etiquetados con CFSE en diferentes momentos, en la proporción de RC etiquetados con CFSE a T0 + 15 min (100 % control). Los diferentes porcentajes obtenidos para cada vez se copian en un gráfico (figura 4) que ilustra la proporción de RC cargados con MGL en circulación con respecto al tiempo.

25 **[0136]** La determinación de la proporción de RC marcados con CFSE en sangre circulante en diferentes momentos muestra su excelente estabilidad de los cuatro productos *in vivo* en ratones, hasta 120 h después de la inyección (83,5 ± 0,6 %, 94,7 ± 0,6 %, 87,3 ± 5,6 % y 76,8 ± 1,3 % de tasa de supervivencia, respectivamente). Para el producto RC-MGL-PLP4, el estudio farmacocinético durante 29 días mostró que la semivida de los glóbulos rojos
30 que encapsulan MGL es de ~12,6 días.

Ejemplo 9. disminución de L-metionina a las 24 h

[0137] Los productos murinos RC-MGL-PLP1, RC-MGL-PLP2 y RC-MGL-PLP3 preparados y caracterizados como en el Ejemplo 2 se inyectan por vía intravenosa en ratones CD1 en una dosis de 8 ml/kg. Después de 6 h, se inyectaron ~0,09 mg de piridoxina (es decir, 150 µL de una solución de clorhidrato de piridoxina 2,9 mM) a ratones que recibieron RC-MGL-PLP2. El nivel plasmático de L-Met se evaluó a las 24 horas mediante HPLC-MS-MS (Piraud M. y col., Rapid Commun. Mass Spectrum. 19, 3287-97, 2005). La siguiente tabla muestra las disminuciones obtenidas en los diversos grupos de ratones inyectados.

Producto administrado	Métodos para proporcionar la coenzima PLP	Nivel de L-Met (µM) en el plasma	% de disminución
-	• Alimentación	82,7 ± 22,5	-
RC-MGL-PLP1	• Alimentación • PLP en el producto terminado (~ 5 µMol/l, RC) • PLP en la solución de conservación del producto terminado (10 µM)	46,3 ± 3,5	44 %
RC-MGL-PLP2 + piridoxina	• Alimentación • PLP encapsulado en el producto terminado (~ 13,4 µMol/l RC) • Inyección IV de ~ 0,09 mg de piridoxina	22,3 ± 4,9	73 %
RC-MGL-PLP3	• Alimentación • PLP encapsulado en el producto terminado (~ 71,4 µMol/l RC)	29,7 ± 4,6	64 %

40 **[0138]** Según la evaluación, el nivel plasmático de L-Met fue de 82,7 ± 22,5 µM en los ratones de control. El producto RC-MGL-PLP1 que contiene MGL encapsulada con una baja concentración de PLP conduce al 44 % de disminución de L-Met, 24 horas después de la administración del producto. Proponemos el supuesto de que el PLP añadido en la solución de conservación del producto no está disponible para la enzima MGL ya que 1) está
45 mayoritariamente unido al BSA presente en la solución de conservación y 2) no puede pasar a través de la membrana

del RC.

[0139] Los resultados muestran que una provisión más consecuente de PLP en el glóbulo rojo ya sea por inyección IV de piridoxina (RC-MGL-PLP2) o por encapsulación de PLP a una concentración más fuerte da la posibilidad de obtener disminuciones de L-Met ~1,5 veces mayores (el 73 y el 64 % de disminución respectivamente).

Ejemplo 10. Farmacodinámica de RC-MGL

[0140] La enzima MGL en su forma libre se inyecta por vía intravenosa en ratones CD1 a una dosis de 8 ml/kg. Se realizaron dos series de inyecciones, la primera con una concentración enzimática de 0,45 mg/ml (producto MGL-L1), la segunda con una concentración dos veces mayor (0,90 mg/ml; producto MGL-L2). Seis horas después de la inyección, ~0,09 mg de piridoxina (es decir, 150 µL de una solución de clorhidrato de piridoxina 2,9 mM) se inyectan en ratones que reciben MGL-L1 y MGL-L2. El nivel plasmático de L-Met se evalúa mediante HPLC-MS-MS a los 15 min, 24, 48 y 120 h después de la inyección de MGL-L1 y a los 15 min, 24, 48, 120 y 144 h después de la inyección de MGL-L2. La Fig. 5 muestra las disminuciones obtenidas en los diversos grupos de ratones inyectados.

[0141] Los resultados muestran que, en ambos grupos experimentales, hay una disminución de L-metionina muy fuerte ($\approx 4 \mu\text{M}$) y muy rápida en el tiempo (15 minutos después de la inyección). Sin embargo, esta disminución es transitoria y no se mantiene a lo largo del tiempo, los niveles de L-metionina vuelven a los valores de control 24 h después de la inyección, y esto sucede a pesar de la provisión inicial de P5P (presente en el amortiguador de dilución, pero también en la formulación de la enzima absorbida en agua) y el complemento con vitamina B6 idéntica a la realizada para el producto RC-MGL-PLP2. Por lo tanto, la actividad de MGL libre se pierde entre 15 min y 24 h después de la inyección, probablemente debido a la rápida eliminación de la enzima circulante.

[0142] En una segunda fase, los productos murinos RC-MGL-PLP2 y RC-MGL-PLP3 preparados y caracterizados como en el Ejemplo 2 se inyectan por vía intravenosa a ratones CD1, en una dosis de 8 ml/kg. Después de 6 h, se inyectan ~0,09 mg de piridoxina (es decir, 150 µL de una solución de clorhidrato de piridoxina 2,9 mM) a los ratones que recibieron RC-MGL-PLP2. El nivel plasmático de L-Met se evalúa a los 15 min, 24, 48 y 120 h después de la inyección mediante HPLC-MS-MS. La Fig. 6 muestra la disminución obtenida en los diversos grupos de ratones inyectados.

[0143] Los resultados muestran que, en ambos grupos experimentales, una disminución de L-metionina se estabilizó a $\sim 35 \mu\text{M}$ y se mantuvo con el tiempo (de 48 a 120 h después de la inyección). Estos resultados indican que el complemento con PLP o con su precursor (vitamina B6) da la posibilidad de mantener una actividad de la MGL encapsulada en los RC durante al menos 120 h después de la inyección en ratones. Como indicación, las concentraciones de L-metionina en plasma 24 y 120 h después de la inyección para los diversos productos (forma libre de MGL o coencapsulada en glóbulos rojos con PLP) se dan en la siguiente tabla:

		Nivel de L-metionina (μM)		
		En T0 (ctrl)	A las 24 h	A las 120 h
MGL libre	MGL-L1	68,2 \pm 21,7	57,0 \pm 8,0	62,5 \pm 12,0
	MGL-L2	68,2 \pm 21,7	57,3 \pm 5,1	51,0 \pm 8,5
MGL encapsulada	RC-MGL-PLP2	82,7 \pm 22,5	29,7 \pm 4,6	36,0 \pm 2,6
	RC-MGL-PLP3	82,7 \pm 22,5	22,3 \pm 4,9	34,3 \pm 7,4

[0144] Con el fin de evaluar la farmacodinámica en tiempos superiores a 120 h, el producto murino RC-MGL-PLP4 que tiene una concentración de MGL encapsulada de 0,5 mg/ml de enzima en el producto terminado se inyecta por vía intravenosa en ratones CD1 con una dosis de 10 ml/kg. Después de 6 h, se inyectan ~0,09 mg de piridoxina (es decir, 150 µL de una solución de clorhidrato de piridoxina 2,9 mM) a los ratones que recibieron RC-MGL-PLP4. El nivel plasmático de L-Met se evalúa mediante HPLC-MS-MS. La Fig. 7 muestra las disminuciones obtenidas a los 15 min, en D1, D2, D5, D14 y D28 después de la inyección.

[0145] Los resultados muestran una disminución significativa de L-metionina ($\approx 10 \mu\text{M}$ frente a $\approx 68 \mu\text{M}$ para el control) y una disminución rápida en el tiempo (15 min después de la inyección). Sin embargo, esta reducción se estabiliza ligeramente entre 24 y 48 h hasta un valor de $\sim 25 \mu\text{M}$ y aumenta hasta $\sim 40 \mu\text{M}$ después de 5 días para finalmente alcanzar los valores de control aproximadamente 12 días después de la inyección de RC-MGL-PLP4.

[0146] Finalmente, la actividad residual de la enzima MGL inyectada se determina según el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 4 en presencia de PLP. La Fig. 8 a continuación enumera las actividades residuales versus el tiempo para la enzima libre MGL-L2, los diversos productos RC-MGL-PLP y para la enzima TPL (datos de la bibliografía).

[0147] Los resultados muestran que, al encapsular MGL en glóbulos rojos murinos, es posible retener una actividad enzimática fuerte a las 24 h (actividad residual comprendida entre ~60 y 100 %). Esta actividad residual disminuye ligeramente a las 48 h (~35 a 100 %) y se mantiene hasta 120 h, es decir, 5 días después de la inyección, en valores comprendidos entre ~20 y ~65 %. La actividad residual de la MGL en su forma libre disminuye drásticamente en los primeros minutos posteriores a la inyección, de modo tal que casi alcanza el valor cero a las 24 h (actividad residual <10 %). En comparación, la actividad residual de la TPL inyectada en su forma libre se copia en la gráfica y 5 h después de la inyección, esta última es solo como máximo 37 % (Elmer y col., 1978). La medición de la actividad residual muestra claramente el beneficio de la encapsulación de las enzimas PLP en los glóbulos rojos para mantener su actividad enzimática.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende eritrocitos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde los eritrocitos encapsulan una enzima dependiente de PLP seleccionada de entre metioninasa, tirosina fenol-liasa, tirosina aminotransferasa y cistationina beta-sintasa, donde la composición comprende además un precursor no fosfato de PLP seleccionado de entre piridoxal, piridoxina y/o piridoxamina encapsulado en los eritrocitos y/o presente fuera de los eritrocitos.
2. La composición según la reivindicación 1, que comprende, como forma no fosfatada de un precursor de PLP, piridoxina.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un precursor de PLP fosfato seleccionado de entre PNP (fosfato de piridoxina) y/o PMP (fosfato de piridoxamina), encapsulado en los eritrocitos.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende de 0,01 a 30, preferentemente de 0,05 a 10 mg de enzima dependiente del PLP por ml de glóbulos rojos.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además piridoxina quinasa (PN quinasa), piridoxina fosfato oxidasa (PNP oxidasa) y/o un agente inhibidor de PLP-fosfatasa.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende metioninasa como enzima dependiente del PLP.
7. Un kit que comprende por separado (i) eritrocitos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde los eritrocitos encapsulan una enzima dependiente de PLP seleccionada de entre metioninasa, tirosina fenol-liasa, tirosina aminotransferasa y cistationina beta-sintasa, y (ii) una solución de precursor no fosfato de PLP seleccionada de entre piridoxal, piridoxina y/o piridoxamina.
8. La composición o el kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como fármaco.
9. Una combinación que comprende (i) eritrocitos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde los eritrocitos encapsulan una enzima dependiente de PLP seleccionada de entre metioninasa, tirosina fenol-liasa, tirosina aminotransferasa y cistationina beta-sintasa, y (ii) una forma no fosfatada de vitamina B6 seleccionada de entre piridoxina (PN), piridoxal (PL) y piridoxamina (PM), como una combinación farmacéutica para uso simultáneo, por separado o secuencial en la terapia.
10. Una composición que comprende eritrocitos y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde los eritrocitos encapsulan una enzima dependiente de PLP seleccionada de entre metioninasa, tirosina fenol-liasa, tirosina aminotransferasa y cistationina beta-sintasa, para su uso en la terapia en un paciente que se administra por separado con una solución de un precursor no fosfato de PLP seleccionado de entre piridoxina (PN), piridoxal (PL) y piridoxamina (PM).
11. La composición o el kit para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende metioninasa, como un fármaco contra el cáncer, en especial, contra un cáncer que comprende células tumorales auxotróficas para la metionina, o como un fármaco que permite el tratamiento de homocistinuria o hiperhomocisteinemia o una enfermedad cardiovascular asociada.
12. La composición o el kit para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende tirosina fenol-liasa, como un fármaco contra el cáncer, en especial, contra un cáncer que comprende células tumorales auxotróficas para la tirosina.
13. La composición o el kit para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende tirosina aminotransferasa, como un fármaco contra el síndrome de Richner-Hanhart (tirosinemia tipo II).
14. La composición o el kit para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende cistationina beta-sintasa, como un fármaco que permite el tratamiento de la homocistinuria o la hiperhomocisteinemia, o una enfermedad cardiovascular asociada.
15. La composición o el kit para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, donde la forma no fosfatada del precursor de PLP o la vitamina B6 es para su administración por inyección o vía oral.

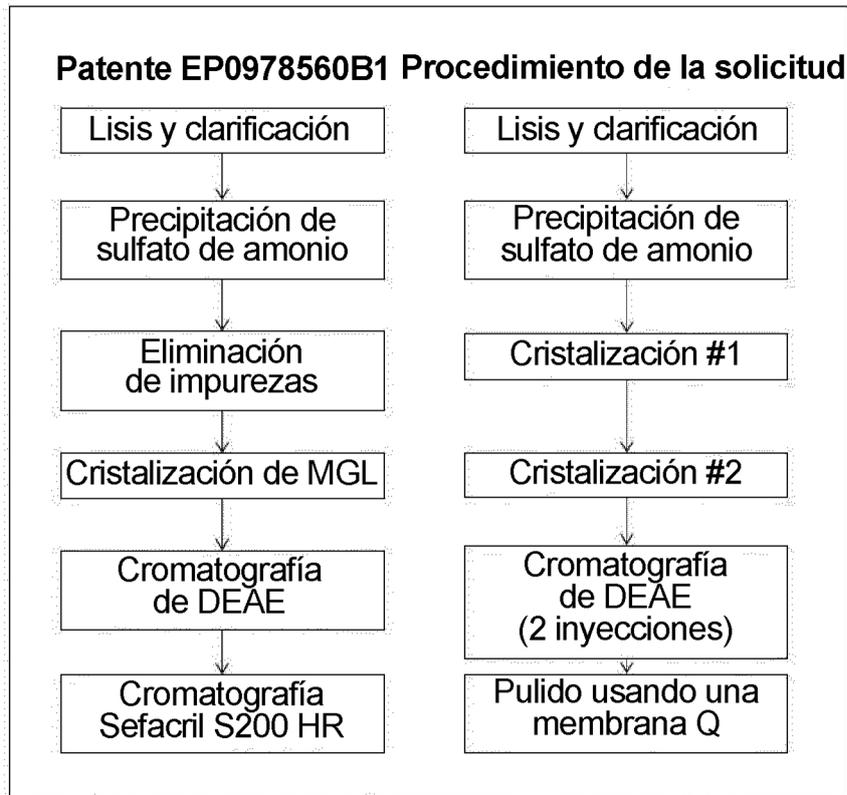


Figura 1

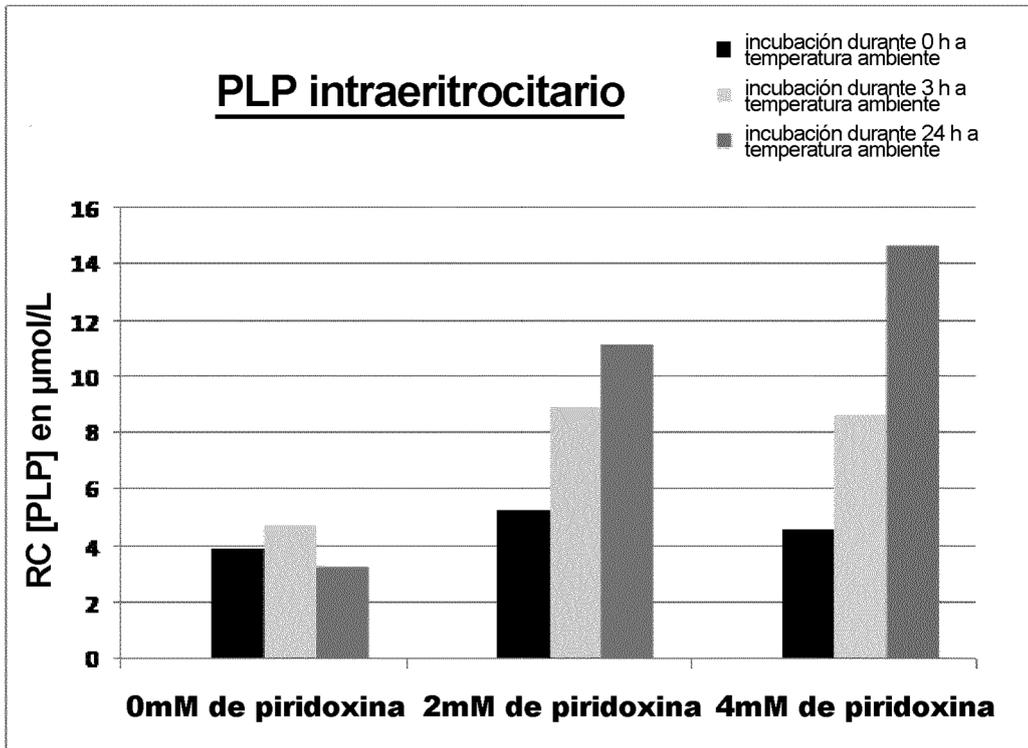


Figura 2

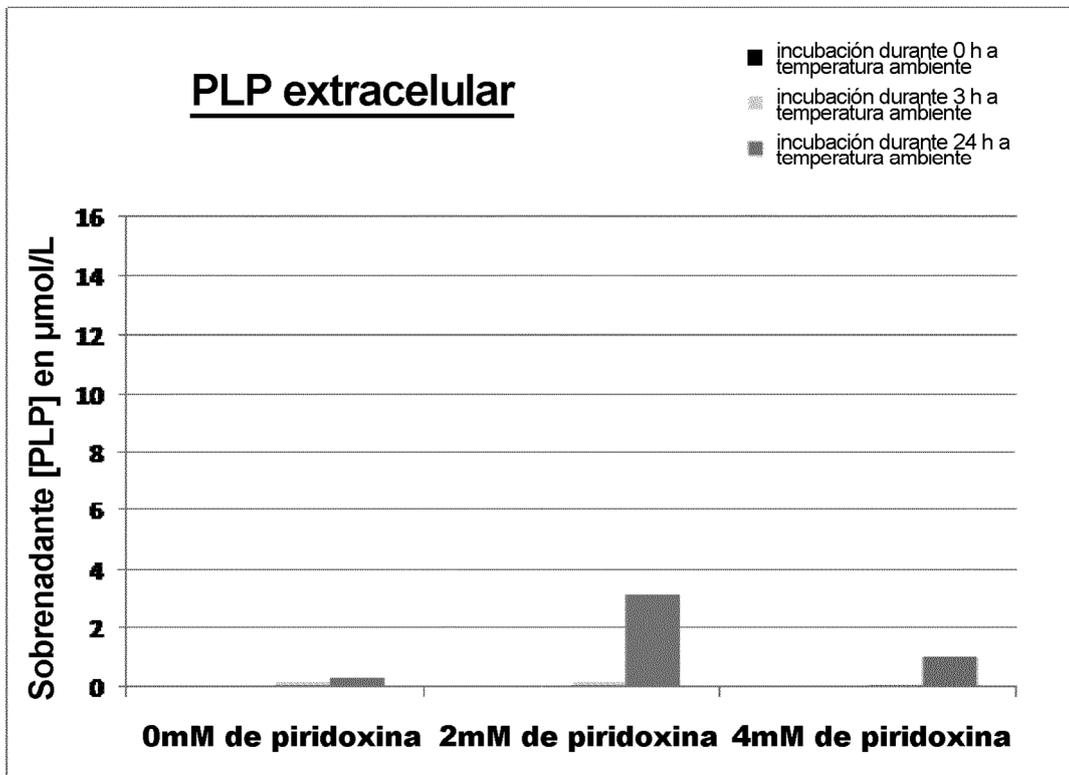


Figura 3

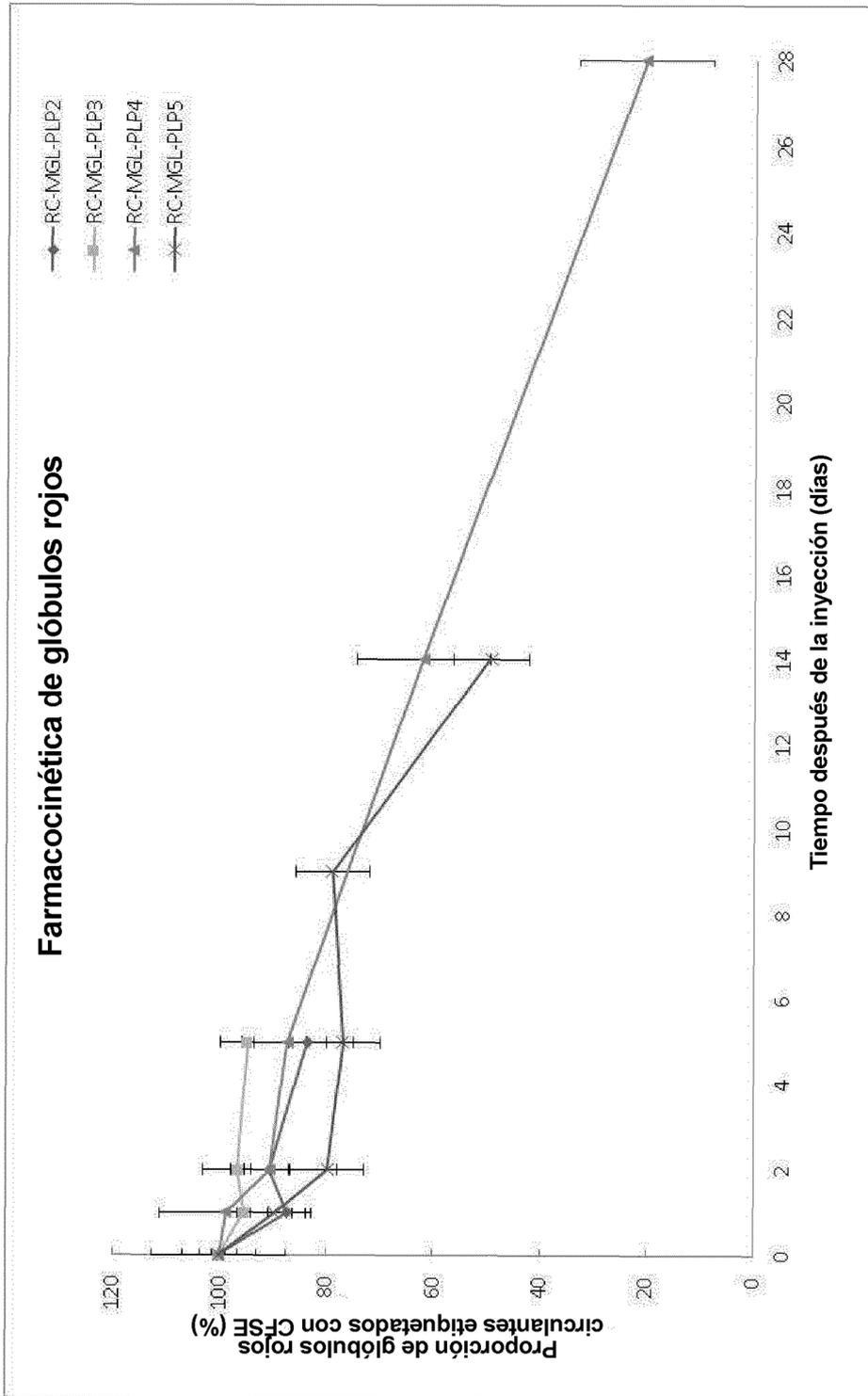


Figura 4

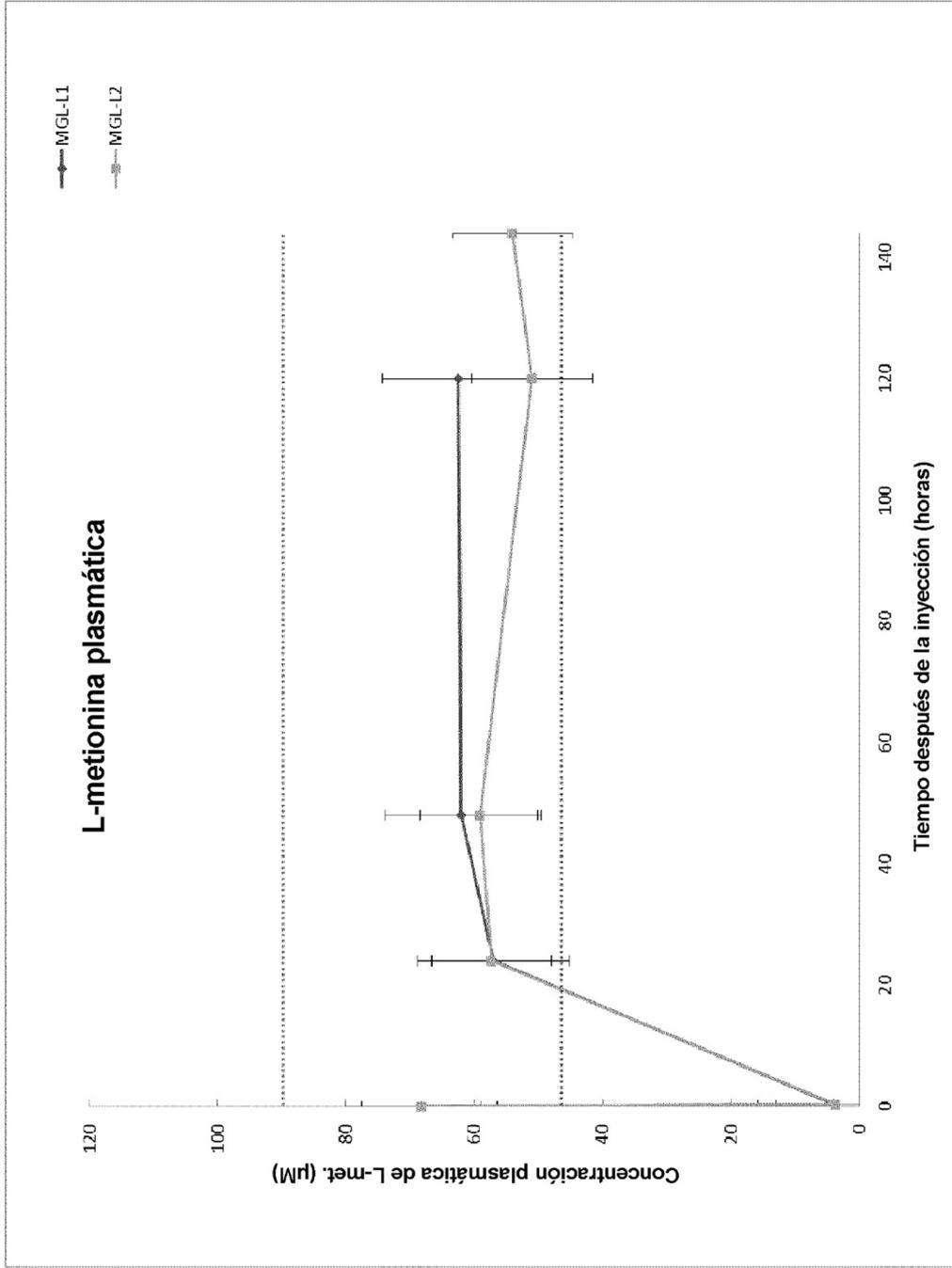


Figura 5

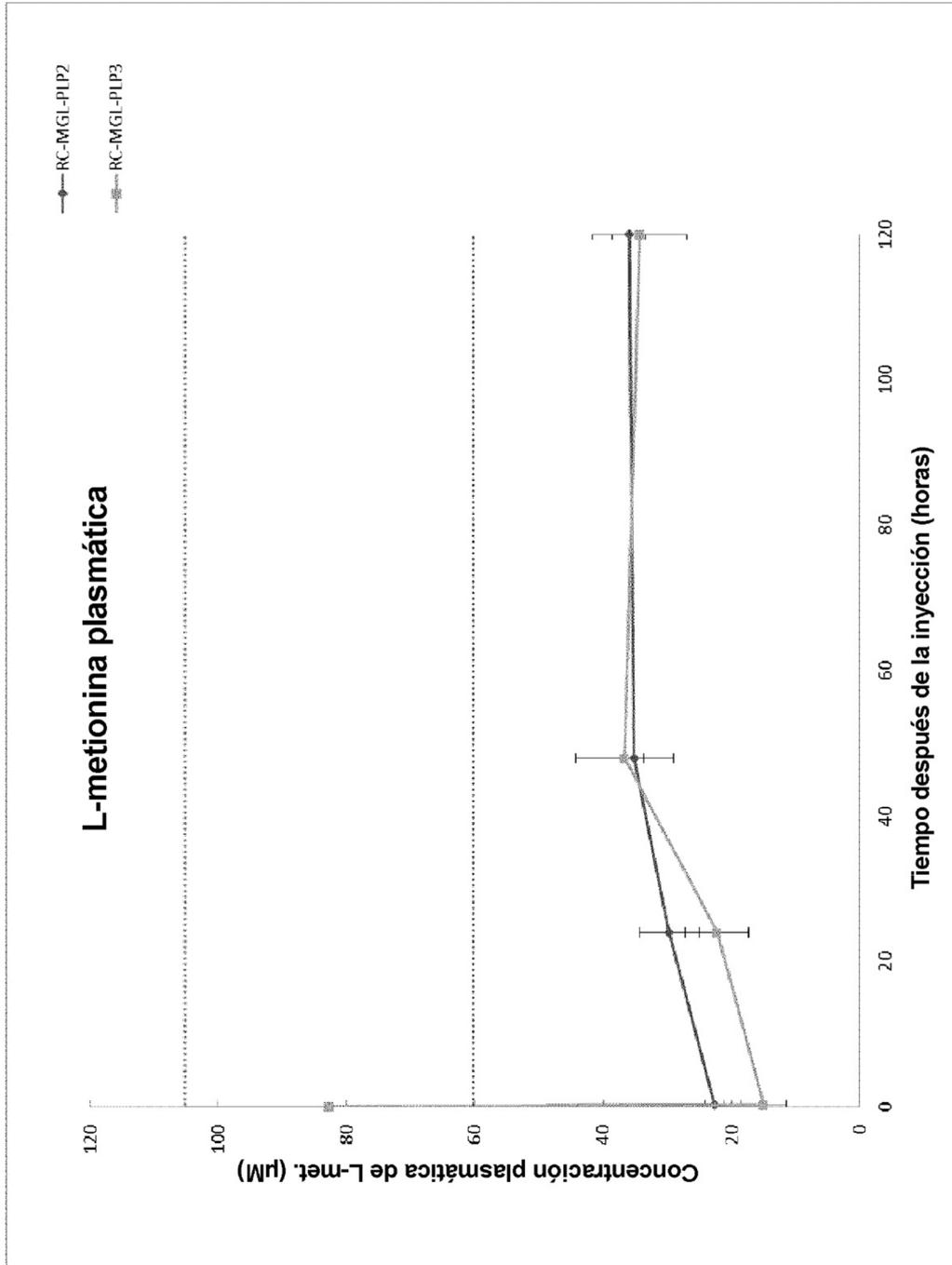


Figura 6

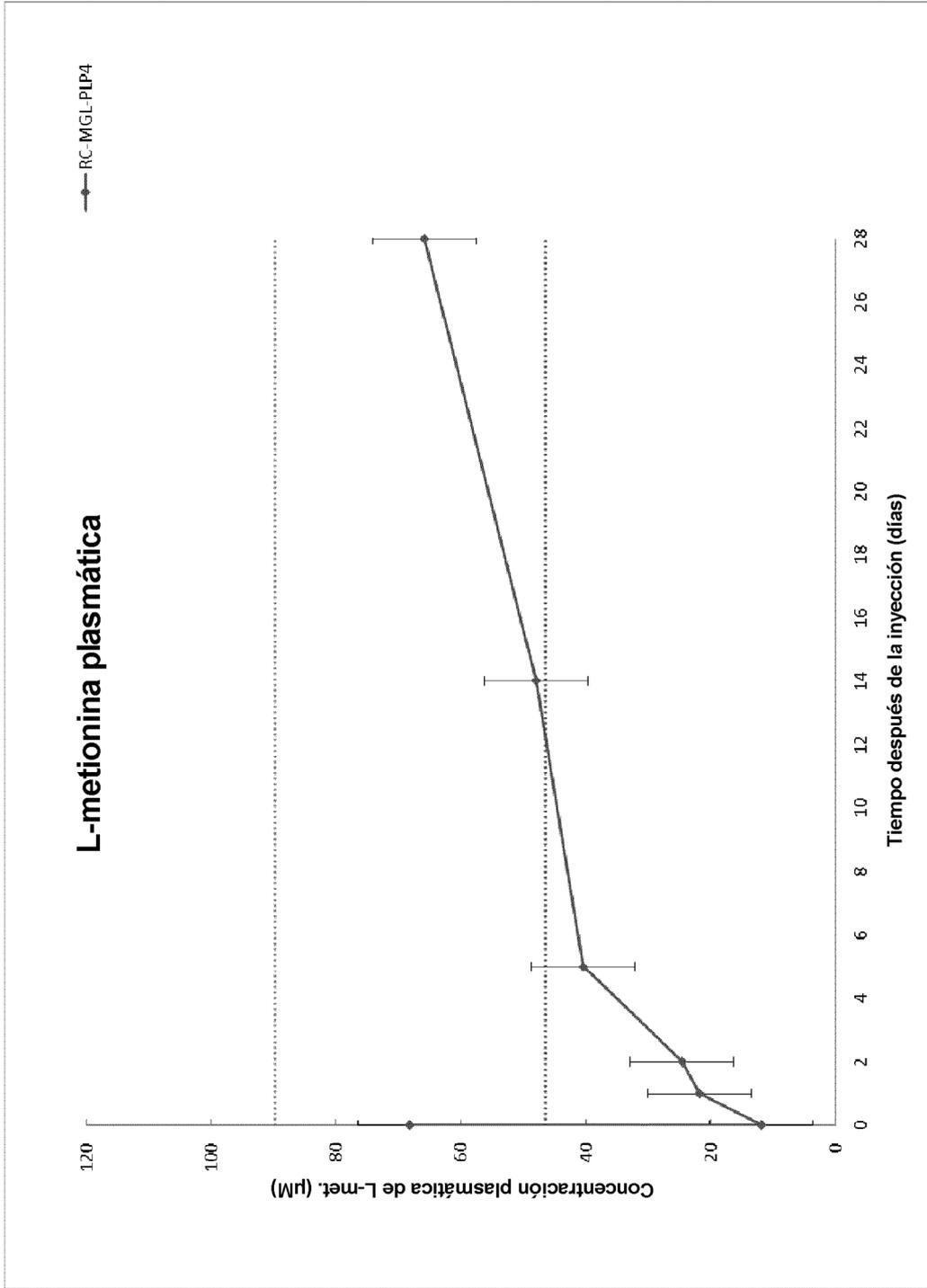


Figura 7

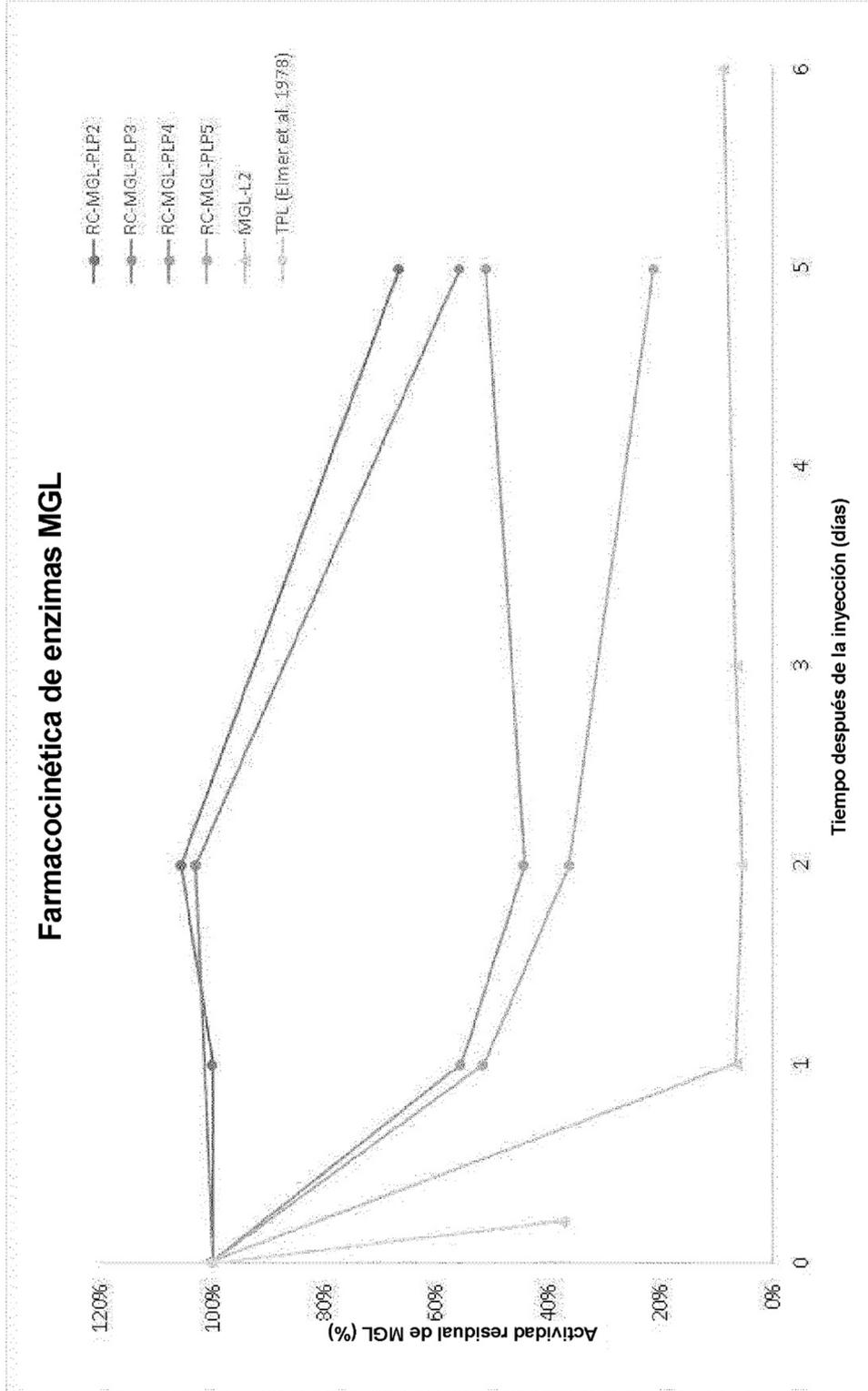


Figura 8