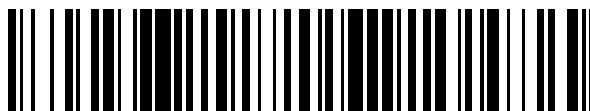


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 258**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008** **E 08762837 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013** **EP 2242507**

54 Título: **Formulación y procedimiento para la prevención y el tratamiento de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher**

30 Prioridad:

13.02.2008 FR 0850910

13.02.2008 US 28295

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

30.05.2013

73 Titular/es:

ERYTECH PHARMA (100.0%)

60 Avenue Rockefeller

69008 Lyon, FR

72 Inventor/es:

BOURGEAUX, VANESSA;

DUFOUR, EMMANUELLE y

GODFRIN, YANN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 405 258 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

Formulación y procedimiento para la prevención y el tratamiento de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher

5

[0001] La invención se refiere a formulaciones y fármacos para su utilización en la prevención y tratamiento de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher.

10 **[0002]** La enfermedad de Gaucher es una enfermedad genética autosómica recesiva provocada por una deficiencia de una enzima lisosómica, la beta-glucocerebrosidasa. Es la enfermedad de almacenamiento lisosómico más habitual con una prevalencia de aproximadamente 1/100.000 entre la población general, pero parece ser más común entre la población judía asquenazí.

15 **[0003]** La enfermedad está causada por mutaciones en el gen de la beta-glucocerebrosidasa. Se han descrito más de 100 mutaciones de este gen con diferentes tasas de incidencia, lo que explica la gran heterogeneidad en su presentación clínica.

20 **[0004]** La beta-glucocerebrosidasa hidroliza la glucosilceramida para formar ceramida y glucosa. La glucosilceramida es un complejo glicolípido procedente de la degradación de las membranas celulares de los glóbulos rojos y los linfocitos.

25 **[0005]** Debido a la deficiencia de beta-glucocerebrosidasa, la glucosilceramida sin degradar (o glucocerebrósido) se acumula en los lisosomas de macrófagos del sistema reticuloendotelial, principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea. Dichos macrófagos cargados con glucocerebrósido se denominan células de Gaucher. Dicha acumulación es la causa de las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad: hepatomegalia, esplenomegalia y complicaciones óseas. Si el hueso se encuentra afectado, esto se puede manifestar en deformaciones, osteopenia u osteonecrosis; el hueso se encuentra afectado en el 80% de los pacientes.

30 **[0006]** Hoy en día el tratamiento de la enfermedad de Gaucher se basa en dos estrategias terapéuticas separadas que están dirigidas a limitar el almacenamiento de glucosilceramida para así prevenir los efectos potencialmente mortales vinculados a su acumulación. La primera de estas estrategias es un tratamiento enzimático sustitutivo con imiglucerasa que es el tratamiento de referencia y se utiliza en primera instancia. La segunda, la terapia de reducción del sustrato con miglustat, es menos eficaz y presenta efectos secundarios más significativos. Así esta terapia está reservada para una indicación en el segundo caso, cuando ya no se tolera la imiglucerasa.

35

[0007] El objetivo del tratamiento mediante la captación de enzima exógena (imiglucerasa) es compensar la deficiencia de glucocerebrosidasa. Inicialmente extraída, hoy en día la enzima es recombinante y se produce en células CHO. También está modificada para así exponer los restos de manosa a sus cadenas de oligosacáridos y así ser reconocida por los receptores de manosa presentes en la superficie de los macrófagos.

40

[0008] El tratamiento se inicia a una dosificación de 120 UI/kg/mes mediante perfusiones de 60 UI/kg cada 15 días. En general la respuesta a la terapia enzimática es buena con una mejora de la hepato-esplenomegalia y de las anomalías hematológicas a los pocos meses. La reducción del volumen hepático es, de media, entre el 20 y el 30% después de 6 y 12 meses de tratamiento, respectivamente, y la regresión del volumen esplénico puede alcanzar el 45 50% después de 12 meses. La cantidad de hemoglobina se incrementa hasta 1,5 g/dl a los seis meses y se normaliza en un año, doblándose el número de plaquetas en 12 meses (Germain DP, Pathologie Biologie, 2004; 52: 343-350). A pesar de una buena tolerancia general, entre el 10 y el 15% de los pacientes desarrolla anticuerpos para la enzima y el 50% de estos pacientes presenta prurito o urticaria durante las perfusiones de la enzima.

50 **[0009]** A pesar de que la terapia de sustitución enzimática hace posible mejorar las anomalías hematológicas y la hepato-esplenomegalia en unos pocos meses, su eficacia está mucho más limitada con respecto a la corrección de las manifestaciones óseas de la enfermedad. El dolor óseo mitiga gradualmente después de 24 meses, pero la mejora objetiva en la manifestación esquelética, puesta de manifiesto por el incremento en la densidad mineral del hueso y una reducción en la infiltración medular, solo se observa después de 3 a 4 años de terapia (Poll LW y col., 55 The British Journal of Radiology, 2002; Suppl. 1: A25-A36). Un estudio publicado por Wenstrup y col. (Wenstrup y col., Journal of Bone and Mineral Research, 2007; 22: 119-126) que sintetiza los resultados obtenidos en el seguimiento durante ocho años de 502 pacientes (160 sin tratar y 342 tratados con la enzima) muestra que no se observó mejora en la densidad mineral del hueso después de 2 años de tratamiento. Se observó un incremento significativo en la densidad ósea después de 4 años y medio. No obstante, no se produce un retorno a una situación

normal hasta después de 8 años de tratamiento.

[0010] La manifestación esquelética está entre las características más incapacitantes de la enfermedad de Gaucher. Los pacientes sufren dolores de huesos y, en algunos casos, crisis óseas. La proporción de pacientes cuya movilidad se ve reducida es del 20%. Los exámenes radiológicos muestran deformidad ósea de tipo matraz Erlenmeyer, osteopenia ocasionalmente responsable de fracturas, osteonecrosis e infiltración de la médula ósea (Wenstrup RJ y col., The British Journal of Radiology, 2002; Suppl. I: A2-A12). El impacto negativo de estas complicaciones sobre la calidad de vida del paciente es significativo. En consecuencia, existe una necesidad real de desarrollar nuevos procedimientos de tratamiento que permitan una mejor gestión de las manifestaciones esqueléticas de la enfermedad de Gaucher.

[0011] Los desarrollos se han basado en la encapsulación de la glucocerebrosidasa en eritrocitos con vistas a mejorar las propiedades farmacológicas de la enzima.

[0012] Ihler y col. (P.N.A.S. USA, 1973, 70, 9: 2663-2666) han demostrado que es posible encapsular enzimas con un elevado peso molecular (beta-glucosidasa y beta-galactosidasa) en eritrocitos por medio de un proceso de lisis-resellado. Los autores creen que la beta-glucocerebrosidasa también se podría encapsular en eritrocitos para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. También se puede realizar la degradación de la membrana de dichos eritrocitos en vistas a dirigir los macrófagos al bazo.

[0013] En Prog Clin Biol Res. 1982; 95: 655-667, Ihler revisa los estudios relativos a la encapsulación de glucocerebrosidasa en eritrocitos. El autor recuerda que la glucocerebrosidasa libre tiene una semi-vida *in vitro* de entre 1 y 3 horas a 37 °C y que, estabilizada con la adición de DTT (ditiotreitól) o BSA (seroalbúmina bovina), su semi-vida se incrementa hasta entre 12 y 13 horas. La encapsulación en eritrocitos incrementa la semi-vida *in vitro* de la enzima hasta entre 15 y 20 horas. La semi-vida de la enzima encapsulada en los eritrocitos se incrementa hasta las 400 horas en presencia de glucosa. El autor sugiere que la encapsulación de la enzima puede protegerla hasta que se introduzca en las células de Gaucher y que esta introducción podría tener lugar mediante eritrofagocitosis. Recuerda que la eritrofagocitosis se puede activar mediante diferentes técnicas, tales como el tratamiento con neuraminidasa, tratamiento térmico, unión de anticuerpos, y tratamiento por medio de reactivos que reaccionan con sulfhidrilo. El autor también muestra que el tratamiento de los glóbulos rojos con glutaraldehído hace posible promover su eliminación por los macrófagos del bazo o del hígado, dependiendo de la concentración de glutaraldehído (Tabla 5). Este autor escribe en un momento muy anterior a la aplicación clínica, que aún es muy incierta y no aborda el direccionamiento de la médula ósea.

[0014] Otro equipo sometió clínicamente a ensayo la utilización de una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan glucocerebrosidasa (Beutler E y col., P.N.A.S. USA, 1977, 74, 10: 4620-4623). Un paciente en estadios avanzados de la enfermedad de Gaucher se sometió a 5 ciclos de tratamiento alternando la administración de glucocerebrosidasa libre y glucocerebrosidasa encapsulada en eritrocitos durante un periodo de 11 meses. La observación clínica del paciente reveló una ligera reducción en el tamaño del hígado así como una reducción en los niveles de glucosilceramida en las células sanguíneas. El paciente finalmente murió. No se ha informado de ningún beneficio clínico del tratamiento.

[0015] Más recientemente, Bax y col. llevaron a cabo experimentos orientados a optimizar los parámetros de encapsulación de la glucocerebrosidasa (Bax BE y col. Biochem Soc Trans. 1996; 24(3): 441 S). Al año siguiente, el mismo equipo publicó los resultados de un estudio piloto dirigido a probar la eficacia de la beta-glucocerebrosidasa encapsulada en eritrocitos en un paciente que padece la enfermedad de Gaucher y que se había sometido a esplenectomía (Bain MD, Bax BE, Webster AD y Chalmers RA. Clin. Sci. (1997) 92, 3P). En este estudio no se registró ninguna mejora clínica en las condiciones del paciente.

[0016] A pesar de que la glucocerebrosidasa se ha encapsulado en glóbulos rojos y de que se ha declarado el beneficio teórico de la enzima encapsulada así como de un direccionamiento del hígado y del bazo, aún está por ver la eficacia clínica de esta formulación. Además, no es posible predecir la capacidad de una formulación de este tipo para impedir o mejorar el tratamiento de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher. Además, no se ha descrito la posibilidad, por una parte, de un direccionamiento eficaz de la médula ósea y, por otra parte, el desarrollo de medios para dirigir la médula ósea y promover la eritrofagocitosis por los macrófagos y las células de Gaucher posiblemente presentes en la médula ósea.

[0017] Por tanto, el objetivo de la invención es proporcionar una solución que haga posible prevenir y/o tratar la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher.

[0018] Otro objeto de la invención es proporcionar un tratamiento de eritrocitos que haga posible dirigir los macrófagos y las células de Gaucher a la médula ósea.

5 **[0019]** Así, la invención se refiere a una formulación que comprende glucocerebrosidasa encapsulada en eritrocitos, en la que los eritrocitos que encapsulan la glucocerebrosidasa se han sometido a un tratamiento químico con una disolución de bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3) para así promover el direccionamiento de los macrófagos y/o las células de Gaucher hacia la médula ósea para su utilización en la prevención o tratamiento de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher. En particular, la formulación hace posible introducir la
10 enzima en el compartimento lisosómico de dichas células. Comprende eritrocitos y glucocerebrosidasa encapsulada en el interior de dichos eritrocitos.

[0020] La invención también proporciona medios para la prevención de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher en pacientes que aún no hayan desarrollado una manifestación de este tipo. Estos
15 pacientes están sanos pero es probable que desarrollen la enfermedad de Gaucher. Los pacientes también pueden padecer la enfermedad de Gaucher sin una manifestación esquelética real o detectable.

[0021] La invención también proporciona medios para tratar la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher en pacientes que hayan desarrollado esta manifestación, cualquiera que sea su estadio, temprano o
20 avanzado.

[0022] La invención también proporciona medios para la prevención de la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher en pacientes que aún no hayan desarrollado una manifestación de este tipo. Estos
25 pacientes están sanos pero es probable que desarrollen la enfermedad de Gaucher. Los pacientes también pueden padecer la enfermedad de Gaucher sin una manifestación esquelética real o detectable.

[0023] La invención también proporciona medios para tratar la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher en pacientes que hayan desarrollado esta manifestación, cualquiera que sea su estadio, temprano o
30 avanzado.

[0024] La enzima glucocerebrosidasa (EC 3.2.1.45) también se denomina glucosilceramidasa, β -glucosidasa, o D-glucosil-N-acilesfingosina glucohidrolasa. Puede ser natural, sintética, artificial o recombinante. Actualmente la enzima es recombinante y se produce en células CHO. Se recomienda dicho origen recombinante. El concepto de glucocerebrosidasa también incluye derivados preparados para así facilitar el reconocimiento por los macrófagos,
35 por ejemplo, derivados que exponen restos de manosa a sus cadenas de oligosacáridos. Una enzima que se puede utilizar es aquella comercializada por Genzyme con el nombre Cerezyme®.

[0025] La formulación para su utilización de acuerdo con la invención está en forma de suspensión de eritrocitos.

40 **[0026]** Preferentemente, la encapsulación de la enzima se consigue por medio de lo que se conoce como proceso de lisis-resellado.

[0027] De acuerdo con una característica de este proceso, se produce una mezcla de eritrocitos y glucocerebrosidasa. Dicha mezcla se somete a condiciones hipotónicas. Los eritrocitos se hinchan, abriendo los
45 poros. De esta forma la enzima penetra en el interior de los eritrocitos. A continuación se restituyen las condiciones isotónicas y así los poros se vuelven a sellar o se vuelven a cerrar de tal forma que los eritrocitos encapsulan la enzima de forma estable.

[0028] De acuerdo con la invención, los eritrocitos se tratan con un agente químico en condiciones que promueven
50 el direccionamiento de las células de la médula ósea (macrófagos y/o células de Gaucher). Dicho direccionamiento es en perjuicio de los macrófagos y las células de Gaucher en el hígado.

[0029] El tratamiento químico se lleva a cabo sobre los eritrocitos que encapsulan la enzima.

55 **[0030]** Un agente químico que se utiliza de acuerdo con la invención y compatible con el uso clínico en seres humanos es el bis(sulfosuccinimidil)suberato (abreviado a BS3 o BS³; CAS 82436-77-9). De forma ventajosa, se utiliza una disolución de este agente.

[0031] De acuerdo con una característica del proceso de tratamiento con BS3, la suspensión de eritrocitos que

encapsula la enzima se pone en contacto con el BS3 durante un periodo de tiempo adecuado que podría ser, en particular, entre 10 minutos aproximadamente y 1 hora aproximadamente. Este periodo de tiempo es de forma ventajosa entre 15 minutos aproximadamente y 45 minutos aproximadamente, preferentemente entre 20 minutos aproximadamente y 40 minutos aproximadamente, normalmente de 30 minutos aproximadamente.

5

[0032] De acuerdo con otra característica del proceso de tratamiento con el BS3, esta incubación preferentemente se lleva a cabo a temperatura ambiente, en particular entre 18 y 25 °C.

[0033] De acuerdo con otra característica del proceso de tratamiento con el BS3, la suspensión de eritrocitos que incorpora la enzima se lava previamente con un tampón apropiado, por ejemplo, PBS.

10

[0034] De acuerdo con otra característica, la suspensión de eritrocitos se lleva a una concentración entre $0,5 \times 10^6$ aproximadamente y 5×10^6 células/μl aproximadamente, normalmente entre 1×10^6 aproximadamente y 3×10^6 células/μl aproximadamente, antes de ponerse en contacto con la disolución de BS3.

15

[0035] De acuerdo con otra característica, se utiliza una disolución de BS3 para obtener una concentración final de BS3 entre 0,1 aproximadamente y 6 mM aproximadamente, preferentemente entre 0,5 aproximadamente y 3 mM aproximadamente, normalmente de 1 mM aproximadamente en la suspensión. En particular, se puede utilizar una disolución de BS3 de 2 mM aproximadamente. Preferentemente, se utiliza una disolución tamponada de BS3, preferentemente que contiene glucosa y un tampón fosfato con el fin de obtener la concentración final deseada de BS3, en particular, de 1 mM aproximadamente. De acuerdo con una característica, el pH de la disolución tamponada de BS3 está de forma ventajosa entre 7,2 aproximadamente y 7,6 aproximadamente, preferentemente a 7,4 aproximadamente. De acuerdo con otra característica, la osmolaridad de la disolución tamponada de BS3 está entre 280 aproximadamente y 320 mOsm aproximadamente.

25

[0036] La incubación se puede detener con un agente, tal como Tris-HCl y las células se pueden separar y posiblemente lavar. Por ejemplo, la mezcla se somete a centrifugación y las células se lavan. Las células se vuelven a suspender en un tampón adecuado, tal como SAG-BSA. La mezcla se deja incubar con dicho agente antes de la separación, por ejemplo mediante centrifugación, durante unos pocos minutos, en particular entre 1 y 10 minutos, a temperatura ambiente.

30

[0037] La cantidad de enzima encapsulada puede estar, en particular, entre 1 y 50 UI de enzima por ml de eritrocitos a un hematocrito del 100%.

[0038] La suspensión puede estar lista para su utilización y tener un hematocrito adecuado para su administración sin dilución.

35

[0039] La suspensión también se puede acondicionar de tal forma que se deba diluir antes de su administración.

[0040] De acuerdo con la invención, el hematocrito de la suspensión lista para su utilización está de forma ventajosa entre el 40% aproximadamente y el 70% aproximadamente, preferentemente entre el 45% aproximadamente el 55% aproximadamente, incluso más preferentemente en el 50% aproximadamente.

40

[0041] En su forma a diluir, el hematocrito puede ser superior, en particular entre el 60% aproximadamente y el 90% aproximadamente.

45

[0042] Preferentemente la suspensión se acondiciona en un volumen de 10 ml aproximadamente a 250 ml aproximadamente. El acondicionamiento preferentemente se lleva a cabo en una bolsa de sangre (o depósito) del tipo adecuado para una transfusión sanguínea. La cantidad de enzima encapsulada correspondiente a la prescripción médica está contenida preferentemente en el interior de la bolsa de sangre.

50

[0043] La bolsa de sangre contiene, por ejemplo, entre 10 y 10.000 UI de enzima, en particular entre 200 y 5000 UI.

[0044] De acuerdo con una característica de la invención, los eritrocitos a administrar se suspenden en una disolución salina farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un ambiente convencional para los glóbulos rojos, en particular una disolución que contiene NaCl y uno más principios seleccionados entre glucosa, dextrosa, adenina y manitol; por ejemplo, SAG-manitol o ADSol). Esta disolución garantiza que se conserven los eritrocitos y también pueden incluir un aditivo de conservación, tal como L-carnitina.

55

[0045] Por tanto la invención proporciona medios para introducir glucocerebrosidasa en macrófagos y/o células de Gaucher en la médula ósea. En particular, la formulación puede introducir la enzima en el compartimento lisosómico de dichas células. Estos medios comprenden la administración al paciente de una formulación o un fármaco para su utilización de acuerdo con la invención.

[0046] En el presente documento también se describe un procedimiento para prevenir y/o tratar la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher, en la que se administra una dosis eficaz de una formulación o un fármaco para su utilización de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

[0047] De acuerdo con una primera forma de realización, el procedimiento descrito en el presente documento está dirigido a prevenir la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher en pacientes que aún no hayan desarrollado una manifestación de este tipo. Dichos pacientes están sanos pero es probable que desarrollen la enfermedad de Gaucher. Los pacientes también pueden sufrir la enfermedad de Gaucher sin manifestación esquelética real o detectable.

[0048] De acuerdo con una segunda forma de realización, el procedimiento descrito en el presente documento está dirigido a tratar la manifestación esquelética de la enfermedad de Gaucher en pacientes que hayan desarrollado esta manifestación, cualquiera que sea su estadio, temprano o avanzado.

[0049] De acuerdo con una forma de realización particular, se lleva a cabo una terapia de choque sobre el paciente. El objeto de la terapia de choque es evitar la aparición de la manifestación esquelética o reducir su progresión o incluso detenerla y de manera ventajosa revertir o eliminar dicha manifestación esquelética. Este tratamiento puede constituir un tratamiento de primera instancia para un paciente que presente para su médico por primera vez un riesgo de desarrollo o síntomas de la enfermedad de Gaucher. El paciente también puede ser resistente a procedimientos de tratamiento convencionales, por ejemplo, un paciente que se haya vuelto resistente después de un cierto periodo de tratamiento mediante procedimientos convencionales. Dicha terapia de choque puede estar recomendada para el tratamiento a largo plazo con una administración de choque o con una pluralidad de administraciones de choque a intervalos específicos.

[0050] De acuerdo con la invención, la formulación o fármaco se debe administrar mediante inyección intravenosa o intra-arterial y preferentemente mediante perfusión desde una bolsa de sangre o similar. Normalmente la administración se lleva a cabo de forma intravenosa en el brazo o mediante un catéter central.

[0051] En particular, de acuerdo con la invención se administran entre 10 ml aproximadamente y 250 ml de formulación aproximadamente (una dosis). Preferentemente la perfusión se utiliza a partir de 50 ml.

[0052] El tratamiento comprende la administración de una dosis o de una pluralidad de dosis de acuerdo con el procedimiento decidido. El procedimiento puede prever varias administraciones mensuales, bimensuales, trimestrales, bianuales o anuales a lo largo del periodo de tratamiento recomendado.

[0053] Las técnicas que hacen posible encapsular los principios activos en glóbulos rojos son conocidas y la técnica fundamental por medio del lisis-resellado, que en este caso es la preferida, se describe las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101, a las cuales puede acudir la persona experta en la materia. Según esta técnica, se puede suministrar el compartimento primario de un elemento de diálisis (por ejemplo, un tubo de diálisis o un cartucho de diálisis) con una suspensión de eritrocitos, mientras que el compartimento secundario contiene una disolución acuosa que es hipotónica en relación con la suspensión de eritrocitos para así lisar dichos eritrocitos; a continuación, en la unidad de resellado, se induce el resellado de los eritrocitos en presencia de la enzima incrementando la presión osmótica y/u oncótica, y a continuación se recoge una suspensión de eritrocitos que contiene la enzima. De acuerdo con una característica de la invención, es preferible lisar una suspensión de eritrocitos que ya contenga la glucocerebrosidasa a encapsular.

[0054] La suspensión de eritrocitos que encapsula la glucocerebrosidasa en particular es probable que se pueda obtener mediante:

- 1 - la suspensión de concentrados de glóbulos rojos en una disolución isotónica con un nivel de hematocrito igual o superior al 65%, y a continuación refrigerando entre +1 y +8 °C,
- 2 - llevando a cabo un procedimiento de lisis y de internalización de la glucocerebrosidasa a una temperatura mantenida de forma constante entre +1 y +8 °C, que comprende el paso de la suspensión de

eritrocitos con un nivel de hematocrito igual o superior al 65% y una disolución de lisis hipotónica refrigerada entre +1 y +8 °C en un tubo o un cartucho de diálisis (se prefiere un cartucho); y ajustando los parámetros de lisis en función de la fragilidad osmótica medida previamente; y
 3 - llevando a cabo un proceso de resellado en presencia de una disolución hipertónica, a una mayor temperatura, en particular entre +30 y +42 °C.

[0055] En una variante preferida, se puede utilizar el procedimiento descrito en el documento WO-A-2006/016247 que permite que la enzima se pueda encapsular de manera útil, reproducible, fiable y estable. Así, es probable que la suspensión de eritrocitos que encapsula la glucocerebrosidasa se obtenga mediante:

- 1 - la suspensión de concentrados de glóbulos rojos en una disolución isotónica con un nivel de hematocrito igual o superior al 65%, y a continuación refrigerando entre +1 y +8 °C,
- 2 - midiendo la fragilidad osmótica en función de una muestra de eritrocitos del mismo concentrado de glóbulos rojos mencionado anteriormente, siendo posible llevar a cabo las etapas 1 y 2 en cualquier orden (incluyendo de forma simultánea),
- 3 - llevando a cabo un procedimiento de lisis y de internalización de la enzima, en particular dentro de la misma cámara, a una temperatura mantenida de forma constante entre +1 y +8 °C, que comprende el paso de la suspensión de eritrocitos con un nivel de hematocrito igual o superior al 65% y una disolución de lisis hipotónica refrigerada entre +1 y +8 °C en un tubo o un cartucho de diálisis (se prefiere un cartucho); y ajustando los parámetros de lisis en función de la fragilidad osmótica medida previamente; y
- 4 - llevando a cabo un proceso de resellado en una segunda cámara en presencia de una disolución hipertónica, a una mayor temperatura, en particular entre +30 y +42 °C.

"Internalización" significa la penetración de la enzima en el interior de los eritrocitos.

[0056] En particular, para la diálisis, el concentrado de glóbulos rojos se suspende en una disolución isotónica con un nivel de hematocrito incrementado, igual o superior al 65% y preferentemente igual o superior al 70%, y dicha suspensión se refrigera entre +1 y +8 °C, preferentemente entre +2 y +6 °C, normalmente a 4 °C aproximadamente. De acuerdo con un procedimiento particular, el nivel de hematocrito está entre el 65 y el 80%, preferentemente entre el 70 y el 80%.

[0057] Cuando se mide, la fragilidad osmótica se mide de manera ventajosa sobre los eritrocitos justo antes de la etapa de lisis, en presencia o en ausencia de la enzima en la suspensión. Los eritrocitos o la suspensión que los contiene está/están de manera ventajosa a una temperatura próxima o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. De acuerdo con otra característica ventajosa de la invención, la medición de la fragilidad osmótica obtenida se utiliza rápidamente, es decir que el proceso de lisis se lleva a cabo poco después de que se haya tomado la muestra. Preferentemente, el periodo de tiempo entre la obtención de la muestra y el comienzo de la lisis es inferior o igual a 30 minutos, preferentemente incluso inferior o igual a 25 minutos o incluso a 20 minutos.

[0058] Con respecto a la forma de llevar a cabo el proceso de lisis-resellado, con mediciones y consideración de la fragilidad osmótica, la persona experta en la materia puede acudir al documento WO-A-2006/016247 para obtener más detalles.

[0059] La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle en referencia a las formas de realización que se incluyen a modo de ejemplos no limitantes.

1/ Acoplamiento de beta-glucocerebrosidasa a Oregon Green® 488

[0060] El acoplamiento de la beta-glucocerebrosidasa a Oregon Green® 488 se llevó a cabo según la publicación de Van Patten y col., 2007, Glycobiology, 17: 467-478. No obstante, se utilizó una relación de enzima/fluorocromo de entre 1:50 y 1:20 en lugar de 1:10 como en la publicación.

2/ Encapsulación de la beta-glucocerebrosidasa mediante diálisis en una columna hipotónica:

[0061] La beta-glucocerebrosidasa (60 kDa), fluorescente (ejemplo 1) o no, se encapsuló en glóbulos rojos (RBC) murinos (ratón OF1) o humanos mediante el procedimiento de diálisis en columna hipotónica. La sangre se pre-centrifugó y a continuación se lavó tres veces en NaCl al 0,9%. Antes de comenzar la diálisis el hematocrito se llevó al 70% en presencia de la enzima que se añadió a una concentración final de 6 UI/ml. Los RBC se dializaron a un caudal de 2 ml/min contra un tampón de lisis de baja osmolaridad (contra flujo a 15 ml/min). Los RBC lisados que

salen de la columna se resellaron añadiendo una disolución de elevada osmolaridad e incubando durante 30 minutos a 37 °C. Después del resellado, los glóbulos rojos se lavaron dos veces en NaCl al 0,9%, glucosa al 0,2%, y a continuación una vez con SAG-manitol suplementado con BSA (6%) para los RBC murinos y solo con SAG-manitol para los RBC humanos. Los glóbulos rojos se llevaron hasta un hematocrito del 50% para constituir el producto final.

5

3/ Tratamiento final con BS3 1 mM:

[0062] Después del resellado, los RBC se lavaron dos veces en PBS con glucosa, y a continuación se diluyeron a $1,7 \times 10^6$ células/μl que estaba en contacto con una disolución de BS3 2 mM que contiene tampón fosfato 50 mM con un pH de 7,4, NaCl 56 mM y glucosa al 0,09%. Los RBC se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación la reacción se detuvo añadiendo un volumen de Tris 20 mM, NaCl 150 mM. Después de 5 minutos de centrifugación, los RBC se lavaron una vez con PBS con glucosa, y a continuación una vez con SAG-manitol suplementado con BSA (6%) para los RBC murinos y solo con SAG-manitol para los RBC humanos. Los glóbulos rojos se llevaron hasta un hematocrito del 50% para constituir el producto final.

15

[0063] Los glóbulos rojos que encapsulan la beta-glucocerebrosidasa se denominan RBC-Gluco. La encapsulación produce RBC-Gluco a una concentración de aproximadamente 2 UI de beta-glucocerebrosidasa/ml de RBC al 100% de hematocrito.

20 **[0064]** Durante el proceso de encapsulación, la sangre total, los RBC lavados, los RBC mezclados con la beta-glucocerebrosidasa (antes de la diálisis) y los RBC cargados con beta-glucocerebrosidasa (después de la diálisis) se analizaron para:

- Hematocrito (Ht)
- 25 - Volumen globular medio (AGV)
- Concentración corpuscular media de hemoglobina (ACCH)
- Concentración de hemoglobina total
- Recuento de células

30 **[0065]** Se pre-lavaron alícuotas de suspensiones celulares antes y después de la diálisis hipotónica para medir la actividad enzimática de la beta-glucocerebrosidasa.

[0066] La dosificación de la beta-glucocerebrosidasa se obtuvo de la publicación de Ron y col., 2005, "ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity", Hum. Mol. Genet., 14: 2387-2398.

35

[0067] Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 1):

	Seres humanos		Ratón	
	RBC-Gluco	RBC-Gluco tratados con BS3	RBC-Gluco	RBC-Gluco tratados con BS3
Estabilidad de la actividad de la glucocerebrosidasa <i>in vitro</i> después de 24h a 4 °C	D0: 1,25 UI/ml	D0: 1,67 UI/ml	D0: 1,25 UI/ml	D0: 1,21 UI/ml
	D1: 1,27 UI/ml	D1: 1,67 UI/ml	D1: 1,22 UI/ml	D1: 1,18 UI/ml
Concentración corpuscular media de la glucocerebrosidasa (UI/ml de RBC al 100% de hematocrito)	2,32	2,8	2,4	2,3
Contenido globular medio de glucocerebrosidasa (UI/10 ⁹ RBC)	0,26	0,27	0,13	0,12
Rendimiento de la encapsulación de la glucocerebrosidasa (%)	39	46	40	39
Rendimiento celular (%)	61	55	65	53

40 **4/ Estudio de la fagocitosis:**

[0068] Glucocerebrosidasa fluorescente (beta-glucocerebrosidasa acoplada a Oregon Green® 488) se encapsuló en glóbulos rojos de ratón mediante el procedimiento de diálisis en columna, y se trató (RBC-Gluco tratados con BS3) o no se trató (RBC-Gluco) con BS3 1 mM. Los glóbulos rojos de ratón OF1 cargados con glucocerebrosidasa y tratados o no tratados con BS3 1 mM se inyectaron por vía intravenosa en ratones normales C57Bl/6 (100×10^9 RBC/kg de ratón). Los ratones normales también fueron inyectados con una cantidad de enzima fluorescente libre equivalente a la encapsulada. Los ratones control fueron inyectados con SAG-manitol + BSA al 6%.

[0069] Una hora y 30 minutos después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los dos huesos femorales de los ratones. Las células de la médula ósea se recuperaron inyectando medio completo (medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, Hepes 10 mM, piruvato sódico 1 mM, β -mercaptoetanol 50 μ M, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml; las concentraciones son concentraciones finales) con una jeringuilla. Después de la lisis de los glóbulos rojos, se contaron las células de médula ósea y se marcaron con anticuerpos acoplados a fluorocromos y específicos para los macrófagos (F4/80, CD11b) y para las células dendríticas (CD11c). Se midió el porcentaje de células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que habían fagocitado la enzima fluorescente encapsulada en el interior de los glóbulos rojos mediante citometría de flujo (FC500 Beckman Coulter).

[0070] Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2):

	Células fagocíticas
Glucocerebrosidasa libre	3,5%
RBC-Gluco	3,8%
RBC-Gluco tratados con BS3	5,7%

5/ Marcaje inmunohistoquímico doble:

[0071] El fluorocromo FITC-Dextrano (70 kDa) se encapsuló en glóbulos rojos murinos (OF1 de ratón) mediante el procedimiento de diálisis en columna hipotónica. La sangre se pre-centrifugó y a continuación se lavó tres veces con PBS. El hematocrito se llevó al 70% en presencia de FITC-Dextrano y se añadió hasta una concentración final de 8 mg/ml antes de comenzar la diálisis. Los RBC se dializaron a un caudal de 2 ml/min contra un tampón de lisis de baja osmolaridad (contra flujo a 15 ml/min). Los RBC lisados que salen de la columna se resellaron añadiendo una disolución de elevada osmolaridad y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Después de dos lavados con PBS con glucosa, los RBC se diluyeron a $1,7 \times 10^6$ células/ μ l antes de entrar en contacto con una disolución de BS3 10 mM que contiene tampón fosfato 50 mM con un pH de 7,4, y glucosa al 0,09%. Los RBC se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación la reacción se detuvo añadiendo un volumen de Tris 20 mM, NaCl 140 mM. Después de 5 minutos de centrifugación, los RBC se lavaron una vez con PBS con glucosa, y a continuación una vez con SAG-manitol suplementado con BSA (6%). Los glóbulos rojos se llevaron hasta un hematocrito del 50% para constituir el producto final que se inyectó en D1 en el ratón. El ratón se sacrificó una hora y media después de la inyección y a continuación se aisló la médula ósea a partir de los huesos femorales y se puso dentro de Tissue-Tek para congelar en nitrógeno. Se realizaron cortes de 10 μ m mediante un criotomo para el análisis inmunohistoquímico. Después de fijar en acetona se llevó a cabo un doble marcaje que muestra el FITC (DAB marrón) y los macrófagos F4/80 (rojo, fucsina nueva).

[0072] La observación microscópica de los cortes mostró la localización simultánea de los macrófagos y el dextrano. La observación confirma la incorporación del dextrano por los macrófagos mediante fagocitosis de los glóbulos rojos.

[0073] El análisis mediante citometría de flujo (FC500 Beckman Coulter) proporciona la siguiente información.

Tabla 3: porcentaje de células fluorescentes en médula ósea 1h 30 después de la inyección intravenosa de RBC en ratones.

Tratamientos	Número total de células fluorescentes
RBC-Dextrano	5,3%

Tratamientos	Número total de células fluorescentes
RBC-Dextrano con BS3	7,4%

[0074] El análisis mediante citometría de flujo muestra que 1h 30 después de la inyección el 7 y el 5% de las células de médula ósea eran fluorescentes en caso de haber recibido tratamiento con BS3 y en caso de no haber recibido tratamiento, respectivamente.

5

La Tabla 4 muestra el porcentaje de células fagocíticas que habían fagocitado glóbulos rojos tratados y sin tratar.

Tratamientos	Macrófagos F4/80	Células dendríticas
RBC-Dextrano	5,2%	7,9%
RBC-Dextrano con BS3	9,5%	16,3%

El atrapamiento y fagocitosis de los RBC en la médula ósea se indujo más rápidamente y de forma más significativa con el tratamiento con BS3 que sin tratamiento.

10

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n que comprende glucocerebrosidasa encapsulada en eritrocitos, en la que los eritrocitos que encapsulan la glucocerebrosidasa se han sometido a tratamiento qu3mico con una disoluci3n de bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3) para as3 promover el direccionamiento de macr3fagos y/o c3lulas de Gaucher en la m3dula 3sea para su utilizaci3n en la prevenci3n o tratamiento de manifestaciones esquel3ticas de la enfermedad de Gaucher.
2. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en la que la suspensi3n de eritrocitos que encapsula la glucocerebrosidasa se pone en contacto con BS3 durante entre 10 minutos y 1 hora, en particular durante entre 15 minutos y 45 minutos, preferentemente durante entre 20 y 40 minutos, y normalmente durante 30 minutos aproximadamente.
3. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con cualquiera de la reivindicaci3n 1 o la reivindicaci3n 2, en la que la incubaci3n con BS3 es a temperatura ambiente.
4. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en la que antes de la incubaci3n con BS3, la suspensi3n de eritrocitos que incorpora la glucocerebrosidasa se lava con un tamp3n adecuado, preferentemente con PBS.
5. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la suspensi3n de eritrocitos que encapsula la glucocerebrosidasa se lleva hasta una concentraci3n de entre $0,5 \times 10^6$ y 5×10^6 c3lulas/ μ l, preferentemente entre 1×10^6 y 3×10^6 c3lulas/ μ l, antes de ponerse en contacto con la disoluci3n de BS3.
6. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la disoluci3n de BS3 se utiliza para obtener una concentraci3n final de BS3 de entre 0,1 y 6 mM, preferentemente entre 0,5 y 3 mM, incluso m3s preferentemente de 1 mM aproximadamente en la suspensi3n.
7. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que se utiliza una disoluci3n tamponada de BS3 que tiene una osmolaridad entre 280 y 320 mOsm y un pH entre 7,2 y 7,6, preferentemente de 7,4.
8. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 7, en la que la disoluci3n de BS3 comprende glucosa y tamp3n fosfato.
9. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la cantidad de enzima encapsulada est3 entre 1 y 50 UI de enzima por ml de eritrocitos a un hematocrito del 100%.
10. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la suspensi3n se acondiciona en una bolsa de sangre que contiene entre 10 y 10.000 UI de glucocerebrosidasa, en particular entre 200 y 5000 UI.
11. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso para prevenir la manifestaci3n esquel3tica de la enfermedad de Gaucher en pacientes que a3n no hayan desarrollado una manifestaci3n de este tipo.
12. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 11, para su uso en pacientes sanos que, no obstante, es probable que desarrollen la enfermedad de Gaucher.
13. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 11, para su uso en pacientes que sufren la enfermedad de Gaucher sin una manifestaci3n esquel3tica real o detectable.
14. Formulaci3n para su utilizaci3n de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el tratamiento de la manifestaci3n esquel3tica de la enfermedad de Gaucher en pacientes que hayan desarrollado dicha manifestaci3n.