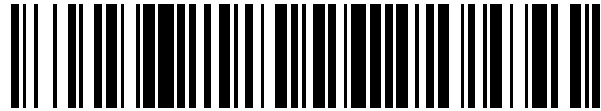


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 165**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09747859 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2358894**

54 Título: **Prueba para predecir la neutralización de actividad de asparaginasa**

30 Prioridad:

07.11.2008 FR 0857604

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

11.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GODFRIN, YANN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 447 165 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

Prueba para predecir la neutralización de actividad de asparaginasa

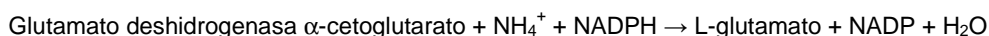
- 5 **[0001]** La invención se refiere a una prueba para diagnosticar la capacidad de un paciente para responder a tratamiento con la enzima terapéutica asparaginasa. En particular se refiere a una prueba para predecir la eficacia de un tratamiento usando asparaginasa en un paciente dado como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- 10 **[0002]** La L-asparaginasa es un componente esencial de los protocolos de quimioterapia que se han usado durante más de 30 años para el tratamiento de leucemias linfoblásticas agudas. Su mecanismo de acción se basa en la hidrólisis del aminoácido plasmático asparagina, un elemento esencial para el crecimiento tumoral de linfoblastos. A diferencia de las células normales, las células linfoblásticas cancerosas son incapaces de producir su asparagina por sí mismas, y dependen de fuentes extracelulares. El tratamiento con asparaginasa las priva de este constituyente esencial y así provoca su muerte.
- 15 **[0003]** La enzima producida a partir de microorganismos se comercializa actualmente en tres formas: las dos primeras se derivan de fuentes bacterianas *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi*, la tercera se obtiene por acoplamiento de enlace covalente de polietilenglicol con la asparaginasa nativa de *Escherichia coli* (PEG-asparaginasa).
- 20 **[0004]** A pesar de su eficacia antileucémica considerable, el tratamiento con asparaginasa está asociado a un cierto número de complicaciones conectadas a la inmunogenicidad de la enzima. Estas complicaciones pueden reflejarse en manifestaciones clínicas o en inactivación silenciosa.
- 25 **[0005]** Se han informado reacciones de hipersensibilidad, con gravedad variable de reacción alérgica moderada a choque anafiláctico, por muchos autores (Wang y col., *Journal of Immunological Methods* 239 (200) 75-83). El desarrollo de reacciones de este tipo, observadas con las tres formas de asparaginasa, generalmente conduce a la suspensión del tratamiento por miedo a una reacción más grave.
- 30 **[0006]** Además, la asparaginasa produce la aparición de anticuerpos circulantes que poseen propiedades neutralizantes, reflejadas en un aumento en la eliminación de la enzima por el sistema reticuloendotelial y una disminución en su eficacia terapéutica (Müller H.J., Boos J. *Crit Rev Oncol/hematol* 1998; (28):97-113). Estos anticuerpos se han observado con las tres formas de la enzima (*E. coli*, *Erwinia* y PEG-asparaginasa), y en este caso no se consigue el objetivo terapéutico de la asparaginasa, que es lograr el rápido y completo agotamiento de la asparagina plasmática, durante un periodo prolongado.
- 35 **[0007]** Esta inactivación de la enzima por factores neutralizantes, principalmente anticuerpos, presentes en el suero del paciente no está acompañada de signos clínicos, es silenciosa para el profesional clínico.
- 40 **[0008]** Por tanto, los inventores han identificado que hay una considerable necesidad de profesionales clínicos que tengan a su disponibilidad una prueba que sea rápida y sea fácil de usar para predecir la presencia de factores neutralizantes de asparaginasa, principalmente anticuerpos, presentes en suero del paciente. Esta prueba haría posible ajustar la dosis de enzima administrada o sustituir la asparaginasa usada con otra forma de asparaginasa que no es sensible, o es menos sensible, a estos factores neutralizantes.
- 45 **[0009]** Se consideraron varias posibilidades para monitorizar la actividad de asparaginasa en un paciente:
- Ensayo de L-asparaginasa en plasma
- 50 • Ensayo de la actividad de L-asparaginasa en plasma
- Ensayo de anticuerpos anti-asparaginasa
- [0010]** El nivel de asparagina en plasma es el principal parámetro bioquímico que refleja el efecto terapéutico que se desea con asparaginasa: un agotamiento rápido, completo y de larga duración de asparagina. Por consiguiente, se han descrito varios procedimientos para su ensayo. La mayoría de ellos se basan en combinar una etapa de separación de los constituyentes de la muestra que va a ensayarse por cromatografía de líquidos de alto rendimiento y detección o cuantificación fluorométrica por espectrometría de masas. Estos procedimientos son tediosos, requieren personal entrenado y su coste y el tiempo necesario son incompatibles con el uso clínico

rutinario.

5 **[0011]** Más recientemente, Verma y col. describieron un procedimiento para el rápido ensayo de asparagina basándose en la co-inmovilización de L-asparaginasa y un indicador coloreado sobre diversos sustratos (membrana de nitrocelulosa, gel de silicona o perlas de alginato de calcio). Cuando uno de estos soportes se pone en contacto con una muestra de suero de un paciente, la L-asparaginasa inmovilizada degradará la asparagina presente. La producción de amonio tras esta reacción de hidrólisis conducirá a un cambio de color del indicador de rojo fenol. Aunque este procedimiento parece cumplir los requisitos de simplicidad y velocidad de uso, los autores no suministran datos por los que pueda validarse, y todavía hay dudas sobre su exactitud.

10 **[0012]** Aparte de la ausencia de procedimientos validados que puedan usarse fácilmente y rápidamente, el ensayo de L-asparaginasa en plasma está limitado por las siguientes consideraciones. *In vivo*, la degradación de asparagina por la acción de asparaginasa está contrarrestada por la producción fisiológica de asparagina mientras que, *in vitro*, el efecto catalítico de la enzima sobre la asparagina persistirá. Como consecuencia directa, cuando una muestra de suero se toma de un paciente tratado con asparaginasa, la presencia de una cantidad residual de enzima conducirá a un sesgo en la medición del nivel de asparagina, que será "falsamente" menor que el nivel fisiológico (Boos y col., *European Journal of Cancer* (1996) 32, 1544-1550). Esta interferencia en el procedimiento analítico resulta en ausencia de correlación con la actividad fisiológica de asparaginasa en el paciente probado.

20 **[0013]** Se han descrito varios procedimientos para el ensayo de L-asparaginasa en plasmas, y aquellos usados casi siempre se basan en la incubación de suero que contiene L-asparaginasa en un tampón que contiene L-asparagina, entonces, después de detener la reacción, la determinación del amonio se produjo usando reactivo de Nessler. Orsonneau y col. propusieron una variante más rápida y más precisa, con la que pacientes tratados con L-asparaginasa pueden monitorizarse (J.L. Orsonneau y col. *Ann Biol Clin* 2004, 62: 568-72). Este procedimiento se basa en la acción de glutamato deshidrogenasa, que usa el amonio producido durante la hidrólisis de L-asparagina por L-asparaginasa para convertir α -cetoglutarato en ácido glutámico.



30 **[0014]** En esta reacción, la cantidad de NADPH oxidada en el transcurso de la reacción es equivalente a la cantidad de amoniaco contenida en la muestra y puede determinarse midiendo la disminución en la densidad óptica. La cinética de la aparición de amonio puede así monitorizarse y la actividad de la L-asparaginasa puede calcularse. Aunque este procedimiento hace posible monitorizar la actividad de L-asparaginasa en un paciente, no da ninguna información predictiva referente a la neutralización de esta enzima por factores presentes en el suero.

35 **[0015]** Wang y col. desarrollaron una prueba de ELISA normalizada para cuantificar IgG anti-asparaginasa en muestras de plasma de pacientes (B. Wang y col., *Journal of Immunological Methods* 239 (2000) 75-83). Esta prueba se usó dentro del alcance de un estudio clínico para medir la concentración de anticuerpos anti-asparaginasa presentes en el suero de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, tratados con L-asparaginasa y que desarrollaron o no desarrollaron una reacción alérgica (M.H. Woo y col., *Leukemia* (1998) 12, 1527-1533). Los autores pudieron mostrar que la mediana de la concentración de anticuerpos anti-asparaginasa fue mayor en los pacientes que desarrollaron una reacción alérgica independientemente de si la medición se lleva a cabo o no antes o después de que se haya producido dicha reacción. Llegan a la conclusión de que hay un beneficio en la práctica clínica de usar una prueba tal para predecir el futuro desarrollo de una reacción alérgica.

45 **[0016]** Sin embargo, el valor predictivo de una prueba tal puede cuestionarse; los intervalos de variación de la concentración de anticuerpos anti-asparaginasa medidos antes del desarrollo de una reacción alérgica se solapan, son respectivamente:

- 50 • de 0,001 a 0,375 unidades de DO para los pacientes que desarrollaron una reacción alérgica posteriormente;
- de 0,004 a 0,064 unidades de DO para los pacientes que no desarrollaron una reacción alérgica posterior

55 **[0017]** Además, la medición de la concentración de anticuerpos no da ninguna información referente a la actividad farmacológica de asparaginasa en el paciente y su posible neutralización por factores presentes en el suero.

[0018] Ogawa C. y col. (*British Journal of Haematology*, 141, Supl. 1, 1-121) desvelan un procedimiento para predecir si una L-asparaginasa puede o no ser activa en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. La

presencia de factores neutralizantes en muestras de sangre se identifica midiendo amoniaco en plasma.

- [0019]** E.H. Panosyan y col., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2004, 26, 4: 217-226 investigaron el anticuerpo anti-asparaginasa y la actividad enzimática de asparaginasa en los sueros de pacientes. Los autores describen un ensayo de neutralización *ex vivo* realizado usando especímenes de sueros de paciente como fuente de anticuerpos anti-asparaginasa. Los especímenes de suero se incubaron con disoluciones de antígeno nativo o PEG-asparaginasa y se midió la restante actividad enzimática de asparaginasa. Los autores recomendaron finalmente la monitorización convencional de anticuerpos anti-asparaginasa en suero en la práctica clínica.
- 10 **[0020]** Por tanto, el objetivo de la presente invención es proponer un enfoque novedoso que haga posible vencer los inconvenientes de la técnica anterior y conocer en un momento dado si un paciente tiene o no factores que puedan neutralizar la actividad de asparaginasa. El procedimiento debe tener la ventaja de ser completamente predictivo, es decir, no debe requerir una etapa de administración de la enzima al paciente que va a diagnosticarse. Debe reflejar la capacidad del paciente para responder a cualquier forma de asparaginasa. Así, el paciente puede ser un paciente que tiene que tratarse por primera vez usando la enzima, o un paciente que ha sido tratado o está siendo actualmente tratado con asparaginasa. Es posible probar la presencia de factores que pueden neutralizar la actividad de la enzima usada para tratamiento previo o actual, que hace posible conocer si el tratamiento con esta enzima puede o no reanudarse y continuarse, y opcionalmente ajustarse. También es posible detectar la presencia de factores que pueden neutralizar la actividad de la enzima considerada para el tratamiento de dicho paciente, que hace posible validar o descartar el uso de una enzima particular.
- 15 **[0021]** Este conocimiento proveerá al médico de orientación mucho más pertinente que con los procedimientos de la técnica anterior, en forma de tratamiento (posología, pauta de dosificación) o de la elección de enzima o su forma de administración. Tanto los factores neutralizantes están ausentes como presentes a un nivel suficientemente bajo para el tratamiento por medio de la enzima de prueba para que sea posible, opcionalmente con fortalecimiento de la dosificación o de la pauta de dosificación. O los factores neutralizantes están presentes a un nivel que es demasiado alto para que un tratamiento tal continúe o se inicie, y entonces la invención hace posible probar y/o recomendar una solución alternativa usando otra forma de la enzima o una forma que es menos sensible o no es sensible a los factores neutralizantes, tales como la enzima incluida en un biovector.
- 25 **[0022]** Así, la invención tiene como objetivo proponer un procedimiento *in vitro* de determinación de la presencia de factores que neutralizan la actividad de asparaginasa en una muestra de sangre de un paciente.
- 30 **[0023]** También tiene como objetivo proponer un procedimiento para la determinación *in vitro* de la capacidad de un paciente para responder (i) positivamente al tratamiento con una asparaginasa o (ii) de no responder a él o (iii) solo responder incompletamente.
- 35 **[0024]** También tiene como objetivo proponer un procedimiento para predecir la eficacia de un tratamiento usando asparaginasa o el hecho de que esta enzima no sea inmediatamente el objetivo de inactivación sustancial de su actividad por factores neutralizantes.
- 40 **[0025]** Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento según la reivindicación 1.
- 45 **[0026]** En el presente documento se desvela un procedimiento de medición *in vitro* de la presencia de factores que neutralizan la actividad de asparaginasa en una muestra de sangre, plasma, suero o medio derivado que puede contener dichos factores neutralizantes, obtenidos de un paciente, que comprende mezclar dicha muestra con una asparaginasa, incubación de dicha mezcla, luego medición de la actividad residual de esta asparaginasa en la mezcla, que refleja y hace posible determinar y cuantificar la presencia de factores neutralizantes en la muestra y, por tanto, *in vivo* en el paciente. El procedimiento hace posible diagnosticar, cualitativamente y cuantitativamente, la presencia de factores neutralizantes de asparaginasa en un paciente. Por factores neutralizantes está previsto no solo anticuerpos anti-asparaginasa, sino también cualquier otro factor que pueda inhibir la asparaginasa o su actividad enzimática, por ejemplo, proteasas tales como asparaginil endopeptidasa humana.
- 50 **[0027]** Así, la invención se refiere a un procedimiento para predecir si una asparaginasa dada puede o no ser activa en un paciente dado. Este procedimiento comprende la determinación *in vitro* de la capacidad de un paciente para responder a un tratamiento con una asparaginasa, en el que una muestra de sangre, plasma, suero o medio derivado que puede contener factores que neutralizan actividad de asparaginasa, obtenidos de dicho paciente, se somete al procedimiento que comprende mezcla de dicha muestra con dicha asparaginasa, incubación de dicha mezcla, luego medición de la actividad enzimática residual de dicha asparaginasa en la mezcla, que refleja y hace

posible determinar y cuantificar la presencia de factores neutralizantes en la muestra y, por tanto, *in vivo* en el paciente, que puede neutralizar actividad de asparaginasa y, por tanto, la capacidad del paciente para responder a tratamiento con esta enzima. Por tanto, la invención ofrece un procedimiento para probar la eficacia de una asparaginasa para un paciente particular.

5

[0028] Dependiendo de la presencia o ausencia de factores neutralizantes, y opcionalmente de su nivel, el procedimiento y el método hacen posible determinar si es probable que el paciente (i) responda o no positivamente al tratamiento con asparaginasa o (ii) no responda a él o (iii) solo responda incompletamente.

10 **[0029]** La muestra puede proceder de un paciente que actualmente está tratándose con una asparaginasa o de un paciente que se ha tratado con una asparaginasa.

[0030] La muestra también puede proceder de un paciente que nunca se ha tratado con una asparaginasa o con esta asparaginasa.

15

[0031] Las asparaginasa usada en la prueba pueden ser una que está siendo usada o se usó en el tratamiento llevado a cabo en el paciente.

20 **[0032]** También puede ser una enzima de una fuente diferente que los presentes inventores desean probar en el paciente para predecir su eficacia. También es posible probar diversas enzimas simultáneamente o sucesivamente para determinar el tratamiento más adecuado para el paciente.

25 **[0033]** Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para predecir la eficacia de un tratamiento con asparaginasa o para predecir el hecho de que esta enzima no se someta inmediatamente a inactivación sustancial por factores neutralizantes.

30 **[0034]** La invención se aplica a todas las formas de asparaginasa, por ejemplo, L-asparaginasa. Sin limitarse a ellas, los presentes inventores pueden mencionar las enzimas nativas obtenidas de cualquier fuente bacteriana, por ejemplo, L-asparaginasa producida por *E. coli*, la enzima producida por *Erwinia*, enzimas mutadas o enzimas modificadas, por ejemplo, las enzimas PEGiladas (PEG-asparaginasa). La enzima también puede ser de origen natural, sintético o recombinante. Pueden estar libres o incluidas en un biovector, por ejemplo, en eritrocitos.

35 **[0035]** La actividad residual de la asparaginasa en la mezcla puede medirse añadiendo, a dicha mezcla, asparagina, preferentemente L-asparagina, y un sistema de reactivos que puede detectar la degradación enzimática de asparagina por asparaginasa activa.

[0036] Según una configuración ventajosa, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

40 (a) incubación de la muestra con una cantidad conocida de asparaginasa;

(b) incubación de dicha mezcla con una cantidad conocida de asparagina, preferentemente en una cantidad que causa saturación con respecto a la cantidad de asparaginasa;

45 (c) incubación de dicha mezcla con el sistema de reactivos que puede proporcionar ensayo de la actividad enzimática residual;

(d) evaluación cualitativa o cuantitativa de la pérdida o retención de actividad enzimática, que se correlaciona con la presencia o el contenido en la muestra, de factores que neutralizan la actividad de asparaginasa.

50 **[0037]** La incubación en la etapa (a) dura en particular de 1 a 60 min. El contenido de enzima es en particular de 0,1 a 5 UI/ml.

55 **[0038]** Puede ser útil y ventajoso inactivar o eliminar cualquier traza de enzima activa en la muestra de prueba. Así, según una característica, antes de la etapa (a) se lleva a cabo una etapa (a₀) de eliminación o inactivación de cualquier asparaginasa presente en la muestra.

[0039] Como variante, antes de la etapa (a) es posible llevar a cabo una etapa (a₀) de medición del contenido de asparaginasa inicial de la muestra, que hace posible tanto verificar que dicha actividad sea cero o insignificante, como restar dicha actividad de la medida mediante el procedimiento.

[0040] Como una variante, conociendo la semividua de la enzima administrada al paciente antes de la prueba, los presentes inventores pueden esperar el tiempo necesario entre la última administración y la toma de la muestra de sangre.

5

[0041] Según una realización particular, la etapa (a) va seguida de una etapa (a1) de eliminación de los complejos inmunitarios de anticuerpo-asparaginasa. Dicha eliminación puede efectuarse fácilmente por centrifugación, de manera que la mezcla implicada en la etapa (b) sea el sobrenadante. Preferentemente, la centrifugación se lleva a cabo a 3000-25000 g durante entre 1 y 30 min a la velocidad especificada.

10

[0042] Según una característica, el sistema de reactivos es sensible a la aparición de ión amonio resultante de la degradación enzimática de asparagina por asparaginasa. Así, la presencia de factores neutralizantes puede determinarse o medirse llevando a cabo una reacción que consume el ión amonio cuantitativamente. Dicho consumo de ión amonio puede ir seguido, ventajosamente cuantitativamente, de la medición de la disminución en la densidad óptica (absorbancia) de la mezcla. En particular se llevan a cabo las siguientes reacciones:

15

(1) asparaginasa + asparagina → ácido aspártico + NH_4^+

(2) α -cetoglutarato + NH_4^+ + NADPH + glutamato deshidrogenasa (catalizador) → glutamato + NADP^+ + H_2O .

20

[0043] La incubación con asparagina se lleva a cabo preferentemente durante 2 a 60 min con una cantidad saturante de asparagina (con respecto a la cantidad de enzima introducida), en particular de 10 a 50 mg/ml.

[0044] La incubación con el sistema de reactivos en particular dura de 3 a 20 min.

25

[0045] Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para determinar si es probable que el paciente (i) responda o no positivamente a tratamiento con una asparaginasa o (ii) no responda a él o (iii) solo responda incompletamente. Por tanto, hace posible confirmar o descartar la posibilidad de uso de tratamiento con la enzima de prueba, o tomar una decisión para modificar la pauta de dosificación o para tratar el paciente usando una asparaginasa diferente, en particular de una forma encapsulada en un biovector.

30

[0046] También en el presente documento se desvela un procedimiento de tratamiento de una patología sensible a asparaginasa en un paciente, que comprende:

35 (A) aplicación del procedimiento de determinación *in vitro* de la capacidad de un paciente para responder a tratamiento con una forma dada de asparaginasa (en particular forma libre o modificada), en el que una muestra de sangre, plasma, suero o medio derivado que puede contener factores neutralizantes de asparaginasa, obtenidos de dicho paciente, se somete a procedimiento que comprende mezcla de dicha muestra con dicha forma de asparaginasa, incubación de dicha mezcla, luego medición de la actividad de asparaginasa residual en la mezcla y

40

(B) tratamiento de la patología por medio de esta asparaginasa en caso (i) o por medio de otra forma de asparaginasa en otros casos.

45

[0047] Según una realización preferida, la otra forma de asparaginasa es asparaginasa encapsulada o incluida en un biovector, en particular encapsulada en eritrocitos. En particular, son eritrocitos producidos por lisis y resellado, por ejemplo, según la enseñanza de la solicitud de patente francesa n° 0408667.

50 **[0048]** Las patologías que pueden beneficiarse de este procedimiento incluyen en particular leucemias, por ejemplo, leucemias linfoblásticas agudas. Los presentes inventores pueden también mencionar, sin limitarse a esto, tumores sólidos (documento WO2007/103290), en particular cáncer pancreático y cáncer de ovario.

[0049] La invención se describirá ahora en más detalle por medio de los ejemplos, que ilustran, pero no limitan, la invención.

55

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunización de un conejo con L-asparaginasa

[0050] Algunos mililitros de suero se toman del conejo antes de la primera inmunización de manera que tenga un suero pre-inmune. Entonces, el conejo se inyecta 4 veces con 500 µg de L-asparaginasa (Kidrolase®, OPI-EUSA Limonest, Francia). Los sueros se toman entre la primera y la segunda inmunización y entre la segunda y la tercera inmunización. Finalmente, después de la última inmunización, el suero total se recupera y se guarda a -20 °C. El suero final se caracteriza según su concentración de proteína total (procedimiento de Biuret) y su concentración de inmunoglobulina total.

Ejemplo 2: Purificación de IgG totales de conejo

10

[0051] La purificación de las IgG totales de conejo del suero final, que contiene IgG anti-asparaginasa, se lleva a cabo con el Kit pure 1 A de Sigma (# PURE1A). Brevemente, 2 ml de suero se clarifican por centrifugación o filtración sobre un filtro de 0,45 µm antes de la purificación de las IgG. Entonces se añaden 4 ml de "tampón de unión" a los 2 ml de suero clarificado. La mezcla se pasa, luego se eluye de la columna siguiendo el protocolo recomendado por Sigma. De manera que puedan inyectarse al animal, las IgG globales se centrifugan en una columna de filtración con un umbral de 10.000 Dalton con el fin de sustituir el tampón de elución con PBS.

15

Ejemplo 3a: Medición de la inhibición de un suero intermedio en la actividad enzimática de L-asparaginasa (ensayo de la mezcla)

20

[0052] El ensayo de la L-asparaginasa se llevó a cabo según el protocolo publicado en: Orsonneau y col., "Automatic kinetic assay of plasma L-asparaginase in therapeutic monitoring of acute lymphoblastic leukaemias", Ann Biol Clin, 62: 568-572.

25

[0053] Se usó primero un suero intermedio (obtenido entre la primera y la segunda inmunización) para elaborar la medición de la inhibición de actividad enzimática. Se usa una concentración de 2 UI/ml de L-asparaginasa. La enzima se pre-incuba durante 15 minutos a 37 °C con varias diluciones de suero, luego se mide la actividad enzimática en la mezcla. Los resultados se presentan en la Tabla 1:

30

Tabla 1

Tubo nº	L-asparaginasa añadida (UI/ ml)	Dilución del suero	L-asparaginasa en la mezcla (IU / ml)	Actividad residual, %
1	2	-	1,96	100
2	2	1,11	0,72	36,43
3	2	1/2	0,78	39,63
4	2	1/4	0,85	43,04
5	2	1/16	1,18	60,16
6	2	1/32	1,29	65,91
7	2	1/128	1,64	83,74

[0054] La Tabla 1 resume las mediciones de actividades enzimáticas residuales de L-asparaginasa en las mezclas (tubos 2 a 7). El suero de conejo inhibe la actividad enzimática de L-asparaginasa: cuanto mayor sea la dilución del suero, más débil será la inhibición.

35

[0055] El tubo 1 constituye un control, que muestra que la incubación de la enzima sola a 37 °C durante 15 minutos no afecta su actividad enzimática.

Ejemplo 3b: Medición de la inhibición de un suero intermedio en la actividad enzimática de L-asparaginasa (ensayo de un sobrenadante)

40

[0056] Se usó un suero intermedio (obtenido entre la primera y la segunda inmunización).

45

[0057] Con el fin de simular fagocitosis de los complejos antígeno-anticuerpo por el sistema reticuloendotelial, la mezcla de L-asparaginasa / suero se incuba durante 15 minutos a 37 °C, luego se centrifuga durante 10 minutos a 17500 g a 4 °C con el fin de eliminar los complejos inmunitarios. La actividad enzimática se ensaya en el sobrenadante. Los resultados del ensayo se presentan en la Tabla 2:

50

Tabla 2

Tubo nº	L-asparaginasa añadida (UI/ml)	Dilución del suero	L-asparaginasa en sobrenadante (UI/ml)	Actividad residual en sobrenadante (%)
1	2	-	1,91	95,63
2	2	1,11	0,21	10,39
3	2	1/2	0,14	6,77
4	2	1/4	0,05	2,72
5	2	1/16	0,03	1,53
6	2	1/32	0,02	0,98
7	2	1/128	0,02	1,00
control	2	pre-inmune	1,82	90,81

[0058] Un control, que sustituye el suero con el suero pre-inmune, se añadió de manera que se probara la especificidad de la interacción entre L-asparaginasa y los anticuerpos anti-asparaginasa presentes en el suero. Esto demuestra que más de un 90 % de la enzima no participa en la interacción con anticuerpos no específicos.

[0059] Los anticuerpos presentes en el suero interaccionaron con toda la enzima para las diluciones 1/4, 1/16, 1/32 y 1/128.

10

Ejemplo 4: Medición de la inhibición de las IgG totales de conejo de la actividad enzimática de L-asparaginasa

[0060] El mismo experimento que el presentado en el Ejemplo 3b se llevó a cabo con las IgG totales de conejo y una concentración de 1,25 UI/ml de L-asparaginasa. Los resultados se presentan en la Tabla 3:

15

Tabla 3

Tubo nº	L-asparaginasa añadida (UI/ml)	Dilución de las IgG	L-asparaginasa en sobrenadante (UI/ml)	Actividad residual en sobrenadante (%)
control	1,25	-	1,19	94,99
1	1,25	-	1,26	100,00
2	-	1/8	0,02	1,38
3	1,25	1/8	0,02	1,52
4	1,25	1/16	0,01	0,40
5	1,25	1/32	0,01	0,62
6	1,25	1/64	0,01	0,98

[0061] Las IgG totales de conejo, que contienen IgG anti-asparaginasa, interaccionan con L-asparaginasa a partir de la dilución 1/64 y producen inhibición total de la actividad enzimática (99,02 % de la enzima precipitada).

Ejemplo 5: Inactivación, por las IgG totales de conejo, de L-asparaginasa libre inyectada en el ratón

[0062] Se fijó un experimento para el ratón (16 ratones) para investigar la inhibición de L-asparaginasa por las IgG anti-asparaginasa.

[0063] Las condiciones experimentales fueron del siguiente modo:

30 - dosis de 100 UI/kg de L-asparaginasa, equivalente a 1,25 UI/ml que circulan en un ratón de 25 g

- inyección de 7,5 µg de IgG totales de conejo.

[0064] La inyección de las IgG o de PBS se lleva a cabo 20 minutos antes de la inyección de L-asparaginasa, libre o encapsulada en glóbulos rojos de ratón (Asp-RBC). Entonces, 6 horas después de esta última inyección mencionada, los ratones se sacrifican y la sangre se recoge.

35

[0065] Entonces, la actividad de L-asparaginasa se ensaya en el plasma y en los RBC. La Tabla 4 resume los valores obtenidos:

Tabla 4

		Actividad de L-asparaginasa (UI/ml)	
		IgG	PBS
Asp-RBC	Glóbulos rojos	0,798 ± 0,126	0,879 ± 0,146
	Plasma	0,013 ± 0,002	0,126 ± 0,029
L-asparaginasa libre	Glóbulos rojos	0,132 ± 0,019	0,098 ± 0,013
	Plasma	0,002 ± 0,002	0,417 ± 0,103

5 **[0066]** El ensayo de L-asparaginasa en los RBC de ratones que recibieron Asp-RBC detecta 0,798 y 0,879 UI/ml en presencia de IgG o de PBS, respectivamente. Por tanto, las IgG presentes en el plasma no tuvieron un efecto inhibitor sobre la enzima encapsulada. En el plasma de estos mismos ratones, L-asparaginasa libre inyectada con Asp-RBC (todavía hay de hecho una pequeña cantidad de enzima libre fuera de los RBC, del orden del 10 % de la dosis) se inhibe en presencia de las IgG (0,013 UI/ml) y sigue siendo activa en presencia de PBS
10 (0,126 UI/ml).

[0067] Cuando la L-asparaginasa libre se inyectó, las IgG inhibieron su actividad (0,002 UI/ml) mientras que la inyección de PBS no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima (0,417 UI/ml). Teniendo en cuenta la semivida de L-asparaginasa libre (10 horas), la medición de 0,417 UI/ml de L-asparaginasa en plasma se corresponde con la
15 actividad residual de la enzima libre 6 horas después de su inyección.

[0068] La concentración en plasma de L-asparagina se midió en el plasma de 14 de los ratones en el estudio (no pudieron usarse dos ya que el volumen era demasiado pequeño). Los resultados se presentan en la Tabla 5.

20

Tabla 5

	L-asparaginasa en plasma (µmol/litro)	
	IgG	PBS
Asp-RBC	< 2	< 2
L-asparaginasa libre	28,09 ± 3,63	< 2

[0069] El agotamiento de L-asparagina fue total cuando los ratones se trataron con Asp-RBC o cuando recibieron L-asparaginasa libre en presencia de PBS.

25

[0070] Solo los ratones tratados con L-asparaginasa libre en presencia de IgG tienen una concentración en plasma de L-asparagina de 28,09 µM. Por tanto, la enzima se inhibió en el plasma por las IgG.

Ejemplo 6: Medición de la inhibición de IgG totales de conejo en la actividad enzimática de PEG-asparaginasa

30

[0071] Las IgG totales de conejo, que contienen IgG anti-asparaginasa, se probaron en PEG-asparaginasa (Sigma nº A5336). El mismo experimento que el presentado en el Ejemplo 4 se llevó a cabo con la PEG-asparaginasa. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

35

Tabla 6

Tubo nº	PEG-Aspa añadida (UI/ml)	Dilución de las IgG	PEG-Aspa ensayada (UI/ml)	Actividad residual en sobrenadante (%)
1	0,40	-	0,360	90,00
2	0,79	1/8	0,023	2,97
3	0,79	1/16	0,026	3,32
4	0,79	1/32	0,023	2,90
5	0,79	1/64	0,029	3,67

[0072] Las IgG de conejo que contienen IgG anti-asparaginasa interaccionaron con la PEG-asparaginasa. La
40 actividad detectada en el sobrenadante es inferior al 4 % de la actividad mixta inicial con las IgG.

Ejemplo 7: Protocolo de prueba

[0073] Este protocolo se aplica a un paciente que está siendo considerado para el tratamiento con una asparaginasa particular. Se toma una pequeña muestra de sangre de este paciente y se trata convencionalmente para obtener una muestra de suero.

[0074] Entonces se sigue el siguiente procedimiento:

(a₀) inactivación o eliminación opcional de cualquier asparaginasa presente en la muestra de suero, o medición de la actividad enzimática residual

(a) incubación de la muestra con 0,1 a 5 UI/ml de asparaginasa durante 1 a 60 min;

(a₁) eliminación opcional de los complejos inmunitarios, preferentemente por centrifugación a 3000-25000 g, durante 1 a 30 min a la velocidad especificada;

(b) incubación de la mezcla de (a) o del sobrenadante de (a₁) durante 2 a 60 min con una cantidad saturante de asparagina, en particular de 10 a 50 mg/ml;

(c) incubación, en particular durante 3 a 20 min, de la mezcla precedente con el sistema de reactivos (α -cetoglutarato, NADPH, glutamato deshidrogenasa) que puede detectar la actividad enzimática residual;

(d) evaluación cualitativa o cuantitativa de la pérdida o retención de actividad enzimática, que se correlaciona con la presencia o el contenido de factores neutralizantes de asparaginasa en la muestra.

[0075] Es posible determinar niveles o umbrales de niveles de actividad residual enzimática dependiendo de si se incluye o no o no la etapa (a₁).

[0076] En un paciente que ya ha sido tratado, si el procedimiento muestra marcada presencia de factores neutralizantes, se recomienda y se aplica un tratamiento de sustitución usando una forma diferente de asparaginasa. En particular, cuando es probable que la forma libre o modificada se inhiba, se recomienda la enzima encapsulada en eritrocitos.

[0077] El mismo protocolo es aplicable simplemente para probar la posible eficacia de una asparaginasa en el paciente.

Ejemplo 8: Efecto de la matriz de suero del paciente sobre la medición de la actividad de L-asparaginasa

[0078] Tres sueros humanos, sin tratamiento previo con L-asparaginasa, se mezclaron con 7 concentraciones de L-asparaginasa (de 0 a 800 UI/l) para garantizar que el suero humano no tuviera interferencia sobre la actividad de medición de L-asparaginasa. Las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C y se centrifugaron 10 minutos a 17500 g a 4 °C. La actividad de L-asparaginasa se comprueba en el sobrenadante. Como control, tampón 1X PBS-4% de BSA se mezcló con las mismas concentraciones de L-asparaginasa. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

45

Tabla 7:

condición	L-asparaginasa añadida UI/l	Actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)		
		sérum 246922	sérum 25579	sérum 255810
pure sérum	800	685	783	788
	400	ND*	442	461
	200	220	220	246
	100	101	125	122
	50	30	76	72
	25	19	37	33
	0	0	0	3
control de tampón	800	753	802	851
	400	407	455	463
	200	218	236	244
	100	115	120	124
	50	63	59	77
	25	24	45	37
	0	0	-	0

* : No determinado

- 5 [0079] No se observó interferencia de suero humano sobre la medición de actividad de L-asparaginasa (en comparación con el control de tampón: véase la Tabla 7 y la Figura 1).

Ejemplo 9: Efecto de la matriz de suero del paciente sobre la medición de actividad de L-asparaginasa y determinación de la actividad basal de suero humano

10

[0080] Cincuenta y dos sueros humanos, sin tratamiento previo con L-asparaginasa, se mezclaron con L-asparaginasa a una concentración final de 500 UI/l para garantizar que el suero humano no tuviera interferencia sobre la medición de actividad de L-asparaginasa. Las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C y se centrifugaron 10 minutos a 17500 g a 4 °C. La actividad de L-asparaginasa se comprueba en el sobrenadante. Como control, 15 tampón 1X PBS-4% de BSA se mezcló con la misma concentración final de L-asparaginasa. Los resultados se presentan en la Tabla 8 y en la Figura 2.

Tabla 8: Medición de la actividad de L-asparaginasa en 52 sueros humanos con L-asparaginasa añadida a una concentración final de 500 (UI/l)

20

Suero	Actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)
1	467
2	493
3	505
4	492
5	466
6	482
7	470
8	474
9	453
10	474
11	482
12	472
13	467
14	469
15	468
16	456
17	476
18	477
19	481

Suero	Actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)
20	477
21	479
22	486
23	478
24	479
25	472
26	479
27	457
28	457
29	483
30	472
31	418
32	462
33	477
34	477
35	467
36	442
37	464
38	464
39	489
40	452
41	475
42	484
43	480
44	480
45	475
46	478
47	473
48	482
49	480
50	473
51	478
52	477
Control	480
Media	473,02
Desviación estándar	13,4
Mean - 2DE	446,22
Mean + 2DE	499,82

[0081] La actividad media medida para los 52 sueros humanos es 473 UI/l, la desviación estándar (DE) es 13,4 UI/l. La actividad media medida para los sueros no es significativamente diferente de la actividad de control. Todos los valores están comprendidos dentro de un intervalo aceptable: de las 52 mediciones, solo 3 están fuera del intervalo de confianza de [media - 2SD; media + 2SD]. La distribución de la actividad medida según el suero ensayado indica que la actividad de L-asparaginasa no está afectada por el suero de matriz (Figura 2).

[0082] Para comprobar la ausencia de la señal de actividad enzimática en suero humano: 25 sueros humanos sin tratamiento previo con L-asparaginasa se ensayaron para actividad de L-asparaginasa.

10

Tabla 9: Medición de la actividad de L-asparaginasa en 25 sueros humanos sin tratamiento previo con L-asparaginasa

Suero	Actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)
1	0
2	2
3	2
4	1
5	2
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
13	0
14	1
15	2
16	1
17	5
18	2
19	0
20	3
21	1
22	0
23	0
24	0
25	0
Media	0,88
Desviación estándar	1,27

[0083] Con cada uno de los 25 sueros humanos ensayados, la actividad de L-asparaginasa es próxima a cero. La actividad media medida es 0,88 UI/l y la desviación estándar es 1,27 UI/l. La actividad máxima medida es 5 UI/l, para el suero 17 esta señal de la actividad basal probablemente no está afectada por la medición de actividad de L-asparaginasa ya que representa el 1 % de la actividad medida para sueros mixtos con L-asparaginasa a una concentración final de 500 UI/l.

Ejemplo 10: Inhibición de la actividad de L-asparaginasa por sueros humanos enriquecidos en IgG anti-asparaginasa

[0084] Dos sueros humanos, sin tratamiento previo con L-asparaginasa, se reunieron y se enriquecieron con concentraciones de IgG anti-asparaginasa que oscilan entre 1 y 100 µg/ml (1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 µg/ml). Las IgG anti-asparaginasa se obtuvieron como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

15 Entonces se añadieron 500 UI/l de L-asparaginasa. Las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C y se centrifugaron 10 minutos a 17500 g a 4 °C. La actividad residual de L-asparaginasa se midió en el sobrenadante. Como control se usó tampón 1X PBS-4% de BSA en lugar del conjunto de sueros humanos. Los resultados se presentan en la Tabla 10 y la Figura 3.

Tabla 10

	IgG de control añadida ($\mu\text{g/ml}$)	IgG anti-aspa añadida ($\mu\text{g/ml}$)	L-asparaginasa añadida (UI/l)	actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)	inhibición (%)
conjunto de suero humano	100		500	589	0,00
	40		500	537	0,00
		0		0	-
		0	500	534	0,00
		1	500	518	3,00
		2	500	548	0,00
		5	500	515	3,56
		10	500	426	20,22
		20	500	4	99,25
		40	500	3	99,44
	80	500	1	99,81	
	100	500	0	100,00	
control de tampón	100		500	558	0,00
	40		500	592	0,00
		0		0	-
		0	500	564	0,00
		1	500	595	0,00
		2	500	562	0,00
		5	500	550	2,48
		10	500	378	32,98
		20	500	7	98,76
		40	500	ND*	-
	80	500	2	99,65	
	100	500	0	100,00	
*: No determinado					

- 5 [0085] Cuando la L-asparaginasa se mezcla con concentraciones crecientes de IgG anti-asparaginasa (IgG específica), en control de suero humano o de tampón, la inhibición de la actividad enzimática total se produce a una concentración de IgG de 20 $\mu\text{g/ml}$ y superior. La inhibición parcial se produce cuando la enzima se mezcla con 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de IgG anti-asparaginasa. Por debajo de 5 $\mu\text{g/ml}$ de IgG anti-asparaginasa, la actividad de L-asparaginasa no se inhibe.
- 10 La no inhibición se observa cuando la L-asparaginasa se incubaba con IgG no específica (véase IgG de control añadida en la Tabla 10).

- [0086] Para refinar la reacción de inhibición de la concentración de IgG anti-asparaginasa entre 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ en la actividad de L-asparaginasa se realizó un experimento con concentraciones de IgG que oscilaban de 8 a 22 $\mu\text{g/ml}$. Como es usual, la L-asparaginasa se añade a una concentración final de 500 UI/l. Todas las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C y se centrifugaron 10 minutos a 17500 g a 4 °C. La actividad residual de L-asparaginasa se mide en el sobrenadante. El ensayo se realiza con un conjunto de suero humano. Los resultados se presentan en la Tabla 11 y la Figura 4.

20

Tabla 11

	IgG anti-aspa añadida ($\mu\text{g/ml}$)	L-asparaginasa añadida (UI/l)	actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)	inhibición (%)
conjunto de suero humano			2	-
	22		1	
		500	580	-
	8	500	510	12,07
	10	500	410	29,31
	12	500	98	83,10

	14	500	65	88,79
	16	500	5	99,14
	18	500	1	99,83
	20	500	0	100,00
	22	500	2	99,66

[0087] La inhibición total de la actividad de L-asparaginasa aparece a una concentración de IgG de 16 µg/ml. Por debajo de 16 µg/ml, la inhibición de la actividad de L-asparaginasa es parcial. Se probó la reacción opuesta: una concentración de IgG anti-asparaginasa fija (13,64 µg/ml correspondiente al 80% de inhibición) se mezcló con 5 concentraciones de L-asparaginasa que oscilaban de 500 a 10000 UI/l. Las muestras se incubaron 15 minutos a 37 °C y se centrifugaron 10 minutos a 17500 g a 4 °C. La actividad residual de L-asparaginasa se mide en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la Tabla 12 y la Figura 5.

Tabla 12

10

	IgG anti-asp añadida (µg/ml)	L-asparaginasa añadida (UI/l)	actividad de L-asparaginasa medida (UI/l)	inhibición (%)
conjunto de suero humano	13,64		0	-
	13,64	500	36	93,00
	13,64	1000	716	32,00
	13,64	5000	5010	9,00
	13,64	10000	10780	3,00
		500	548	-
		1000	1052	-
		5000	5480	-
		10000	11080	-

[0088] Cuanto más concentrada esté la L-asparaginasa, menos concentración de IgG fija (13,64 µg/ml) inhibe su actividad. Una cantidad fija de IgG anti-asparaginasa inhibe una cantidad fija de L-asparaginasa. Por tanto, la actividad de inhibición de L-asparaginasa es dependiente de la dosis.

15

Ejemplo 11: Prueba de 57 sueros humanos de 17 pacientes tratados con L-asparaginasa

[0089] Para garantizar que el ensayo tiene la capacidad de cuantificar la neutralización de asparaginasa en un paciente: 57 sueros humanos muestreados de 17 pacientes con leucemia linfoblástica aguda bajo tratamiento con L-asparaginasa se probaron según el protocolo de prueba descrito en el Ejemplo 7. Las muestras se tomaron en diferentes momentos del transcurso de tiempo y se realizó una medida de la actividad enzimática de L-asparaginasa residual para verificar que esta actividad era insignificante y no interfería con el procedimiento de prueba.

20

[0090] Entonces, se mezclaron los sueros con L-asparaginasa a una concentración final de 500 UI/l y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad de L-asparaginasa se determinó entonces antes y después de una etapa de centrifugación de 6 minutos a 7800 rpm. Como control, tampón 1X PBS-4% de BSA se mezcló con L-asparaginasa a una concentración final de 500 UI/l. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 13 y en la Figura 6.

25

30

Tabla 13: Prueba de 57 sueros humanos de 17 pacientes bajo tratamiento con L-asparaginasa

Paciente	Suero	Actividad inicial (UI/l)	Actividad después de la adición de L-asparaginasa (UI/l)	Actividad después de la adición de L-asparaginasa y centrifugación (UI/l)	% de inhibición sin centrifugación	% de inhibición después de la centrifugación
Control		6	655	662	NA	NA
1	1	2	551	515	15,88	22,21
	2	2	440	342	32,82	48,34
	3	1	559	518	14,66	21,75
	4	2	658	655	-0,46	1,06

ES 2 447 165 T3

Paciente	Suero	Actividad inicial (UI/l)	Actividad después de la adición de L-asparaginasa (UI/l)	Actividad después de la adición de L-y centrifugación (UI/l)	% de inhibición sin centrifugación	% de inhibición después de la centrifugación
2	5	7	NA	441	NA	33,38
	6	13	767	727	-17,1	-9,82
3	7	1	706	701	-7,79	-5,89
	8	-2	724	716	-10,53	-8,16
	9	11	692	731	-5,65	-10,42
	10	2	680	666	-3,82	-0,6
	11	1	711	733	-8,55	-10,73
	12	1	754	711	-15,11	-7,4
4	13	2	726	730	-10,84	-10,27
	14	2	664	744	-1,37	-12,39
	15	15	804	667	-22,75	-0,76
Control		6	636		NA	NA
5	16	1	690	516	-8,49	18,87
	17	2	649	678	-2,04	-6,6
	18	2	684	575	-7,55	9,59
	19	ND	622	633	2,2	0,47
	20	1	670	604	-5,35	5,03
	21	1	609	583	4,25	8,33
6	22	1	659	519	-3,62	18,4
7	23	2	508	492	20,13	22,64
8	24	1	761	473	-19,65	25,63
	25	0	633	608	0,47	4,4
9	26	4	705	524	-10,85	17,61
	27	2	656	525	-3,14	17,45
10	28	3	608	623	4,4	2,04
	29	1	649	560	-2,04	11,95
	30	3	610	609	4,09	4,25
	31	7	694	570	-9,12	10,38
	32	-1	598	586	5,97	7,86
	33	2	589	516	7,39	18,87
	34	0	527	NA	17,14	NA
Control		3	661	629	NA	NA
11	35	2	713	587	-7,87	6,68
	36	1	499	667	24,51	-6,04
	37	3	596	666	9,83	-5,88
	38	2	701	579	-6,05	7,95
	39	2	850	408	-28,59	35,14
12	40	2	798	446	-20,73	29,09
	41	2	599	596	9,38	5,25
	42	5	814	448	-23,15	28,78
	43	3	752	265	-13,77	57,87
13	44	1	705	570	-6,66	9,38
14	45	1	685	659	-3,63	-4,77
15	46	1	573	388	13,31	38,31
	47	2	492	408	25,57	35,14
	48	1	605	678	8,47	-7,79
	49	2	571	355	13,62	43,56
	50	2	725	275	-9,68	56,28
	51	2	464	437	29,8	30,52
	52	3	497	475	24,81	24,48

Paciente	Suero	Actividad inicial (UI/l)	Actividad después de la adición de L-asparaginasa (UI/l)	Actividad después de la adición de L-asparaginasa y centrifugación (UI/l)	% de inhibición sin centrifugación	% de inhibición después de la centrifugación
	53	0	540	445	18,31	29,25
16	54	3	550	524	16,79	16,69
	55	2	568	637	14,07	-1,27
	56	1	595	379	9,98	39,75
	57	1	709	585	-7,26	7
ND: No determinado NA: No aplicable						

[0091] Todas las muestras tienen una actividad residual de asparaginasa que es insignificante, la mayor actividad residual es de 15 UI/l y no debe interferir con el procedimiento de prueba ya que representa solo el 3 % de la L-asparaginasa añadida teórica. La actividad de asparaginasa medida para el control es superior a la esperada (655, 636 y 661 UI/l, respectivamente, para los 3 controles en comparación con las 500 UI/l que se esperaban). El porcentaje de inhibición de la actividad de asparaginasa se calculó basándose en la actividad enzimática medida para el control. El hecho de que numerosos valores de porcentaje de inhibición sean negativos indica un sesgo en el procedimiento de medición.

El porcentaje de inhibición de la actividad de asparaginasa es superior después de la centrifugación, sugiriendo que la etapa de centrifugación ha eliminado algunos complejos inmunitarios que se formaron entre asparaginasa y anticuerpos anti-asparaginasa.

[0092] En los 17 pacientes ensayados, 14 experimentan una inhibición de la actividad de asparaginasa por factores presentes en su suero (Figura 6). Ocho pacientes tienen un porcentaje de inhibición superior al 20 %, pero solo tres pacientes tienen un porcentaje de inhibición superior al 40 % (Figura 6).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir si una asparaginasa puede ser o no activa en un paciente, en el que se mide *in vitro* la presencia de factores que neutralizan la actividad de asparaginasa en una muestra de sangre, plasma, suero o medio derivado que puede contener dichos factores neutralizantes, obtenidos de dicho paciente, procedimiento que comprende mezcla de dicha muestra con dicha asparaginasa, incubación de dicha mezcla, luego medición de la actividad residual de dicha asparaginasa en la mezcla, y determinación o cuantificación de la presencia de dichos factores neutralizantes.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es de un paciente que actualmente está tratándose con una asparaginasa o de un paciente que se ha tratado con una asparaginasa.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la medición de la actividad residual de asparaginasa en la mezcla se lleva a cabo añadiendo, a dicha mezcla, asparagina y un sistema de reactivos adecuados para ensayar la actividad enzimática residual.
- 15 4. El procedimiento según la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:
- (a) incubación de la muestra con una cantidad conocida de dicha asparaginasa;
- 20 (b) incubación de dicha mezcla con una cantidad conocida de asparagina;
- (c) incubación de dicha mezcla con el sistema de reactivos adecuados para ensayar la actividad enzimática residual;
- 25 (d) evaluación cualitativa o cuantitativa de la pérdida o retención de actividad enzimática, que se correlaciona con la presencia o con el contenido de factores neutralizantes de dicha asparaginasa en la muestra.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, que comprende, antes de la etapa (a), una etapa (a₀) de eliminación o inactivación de cualquier asparaginasa que puede estar presente en la muestra.
- 30 6. El procedimiento según la reivindicación 4, que comprende, antes de la etapa (a), una etapa (a₀) de medición del contenido de referencia de asparaginasa en la muestra.
7. El procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el sistema de reactivos es sensible a la aparición del ión amonio resultante de la degradación enzimática de asparagina por asparaginasa.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 7, que emplea una reacción que consume el ión amonio cuantitativamente.
- 40 9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el consumo cuantitativo del ión amonio se mide midiendo la disminución en densidad óptica de la mezcla.
10. El procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 9, que emplea las siguientes reacciones:
- 45 (1) asparaginasa + asparagina → ácido aspártico + NH₄⁺
- (2) α-cetoglutarato + NH₄⁺ + NADPH + glutamato deshidrogenasa (catalizador) → glutamato + NADP⁺ + H₂O.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la determinación de la capacidad del paciente para responder (i) positivamente a tratamiento con esta forma de asparaginasa o (ii) no responder a él o (iii) solo responder incompletamente.
- 50 12. El procedimiento según la reivindicación 11, que comprende, para los casos (ii) y (iii), la decisión de tratar al paciente usando alguna otra asparaginasa.
- 55 13. El procedimiento según la reivindicación 11, que comprende, para el caso (i), la decisión de tratar el paciente usando esta asparaginasa.
14. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que la otra asparaginasa es una asparaginasa

incluida en un biovector.

15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que la otra asparaginasa está encapsulada en eritrocitos.

5

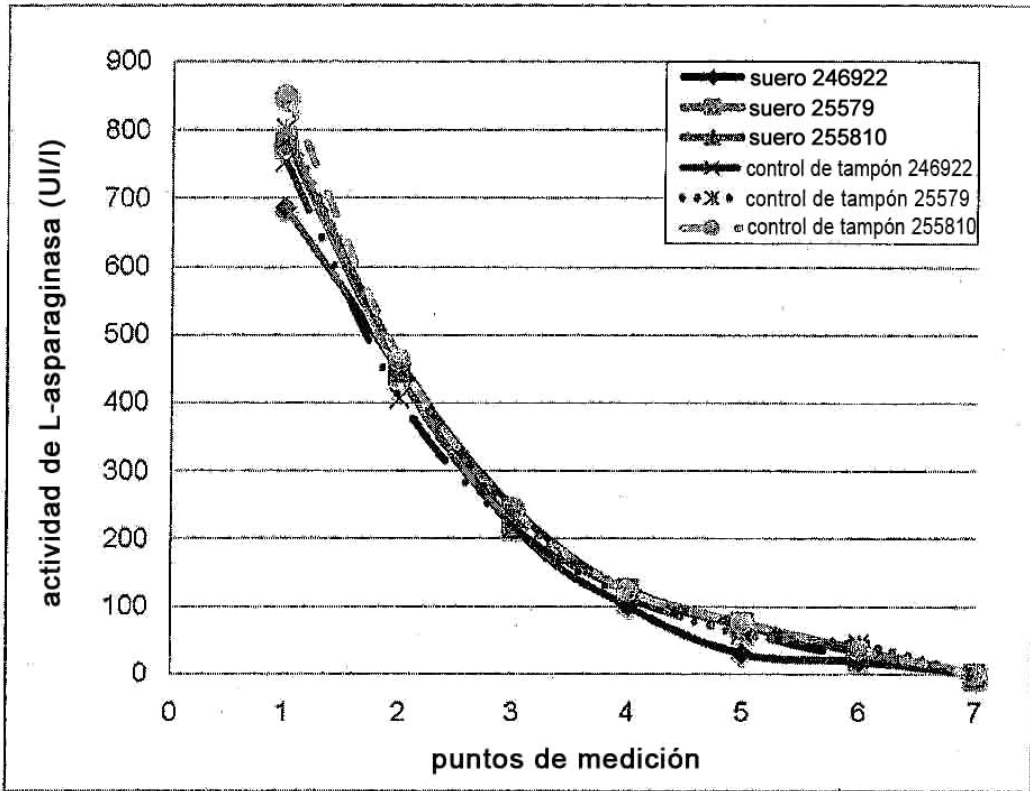


Figura 1: Se midieron siete concentraciones de L-asparaginasa fijas (que oscilan de 0 a 800 UI/I) en tres sueros humanos y controles de tampón

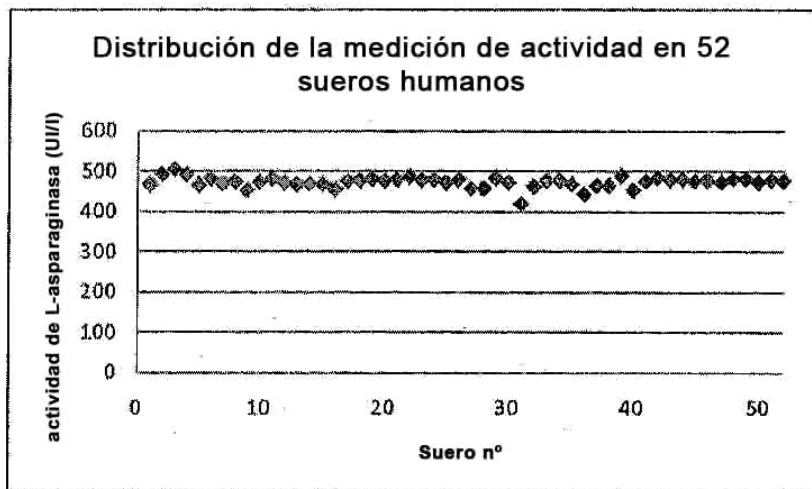


Figura 2: Distribución de la actividad medida para 52 sueros humanos mezclados con L-asparaginasa a una concentración final de 500 UI/I

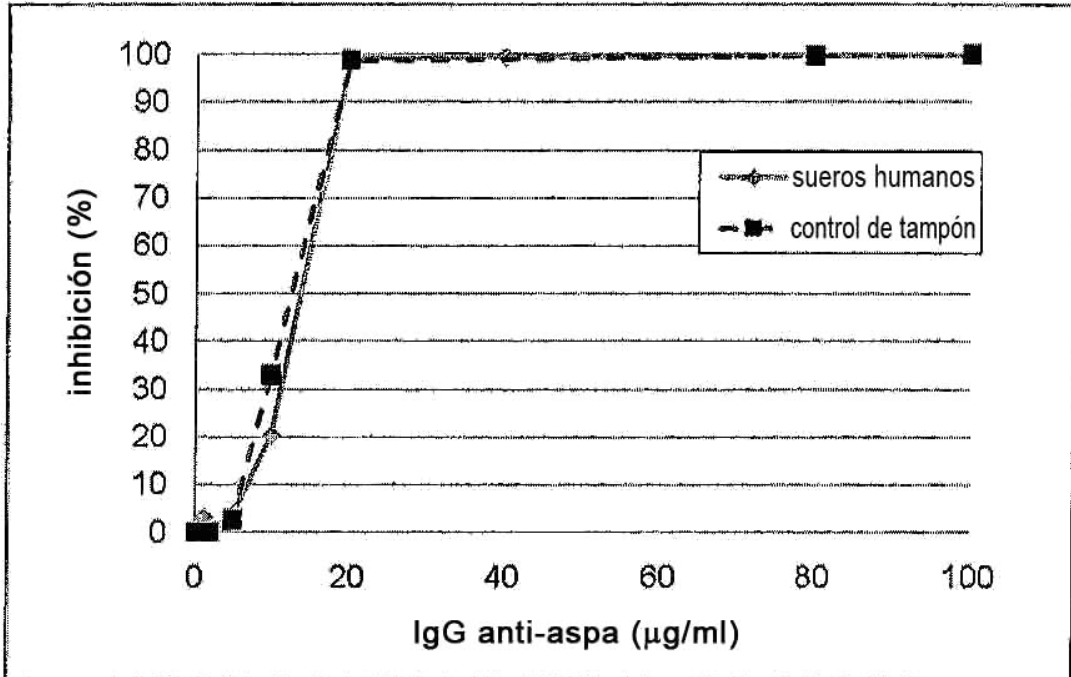


Figura 3: Inhibición de la actividad de L-asparaginasa frente a concentración de IgG anti-asparaginasa

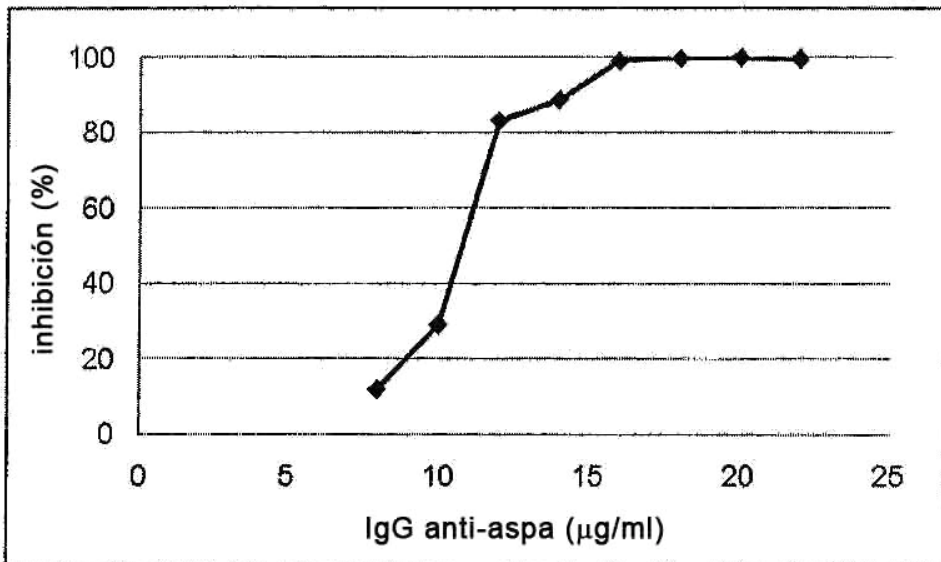


Figura 4: Inhibición de la actividad de L-asparaginasa frente a baja concentración de IgG anti-asparaginasa

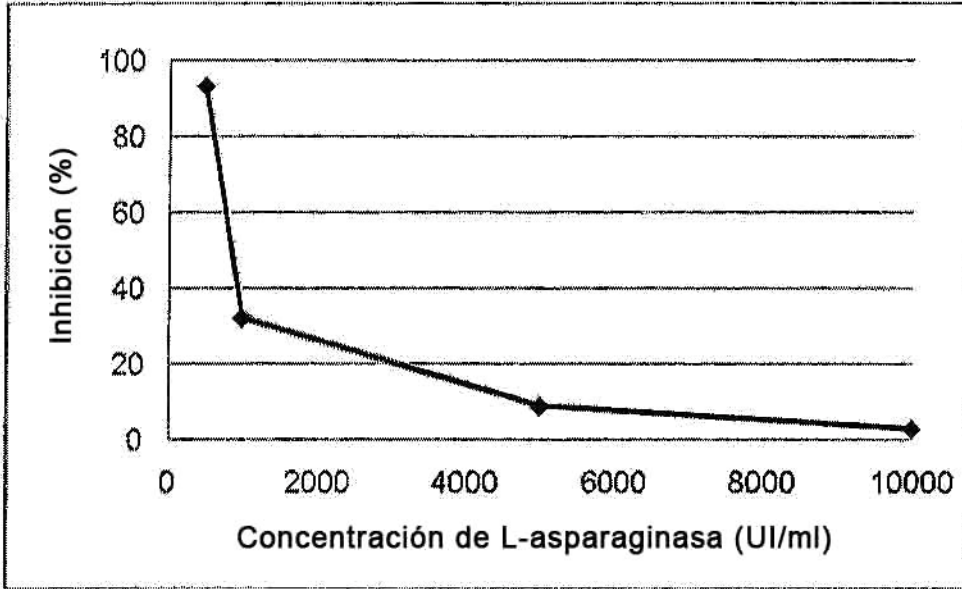


Figura 5: Inhibición de la actividad de L-asparaginasa frente a concentración de anti-asparaginasa

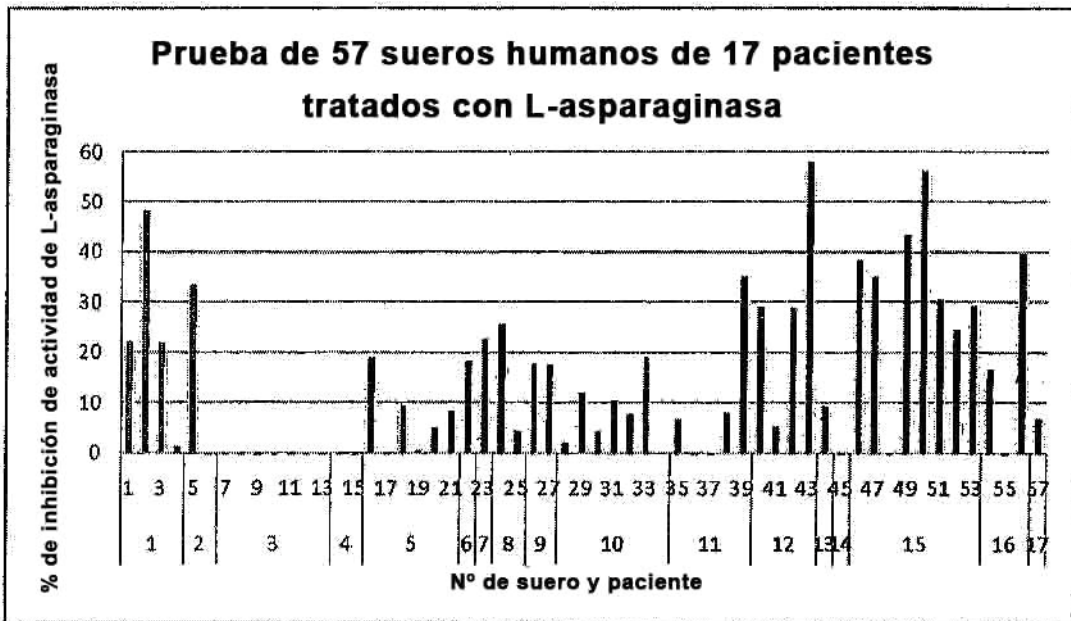


Figura 6: Prueba de 57 sueros humanos de 17 pacientes tratados con L-asparaginasa