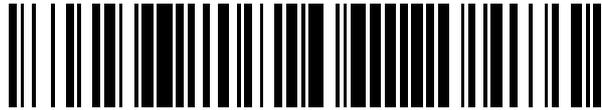


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 967**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/663 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09720545 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2249816**

54 Título: **Formulación y método para la prevención y el tratamiento de las metástasis óseas o de otras enfermedades óseas**

30 Prioridad:

10.03.2008 FR 0851521

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

07.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOURGEAUX, VANESSA y
GODFRIN, YANN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 544 967 T3

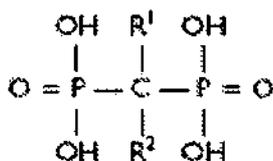
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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 método para la prevención y el tratamiento de las metástasis óseas o de otras enfermedades óseas

5 **[0001]** La invención se refiere a formulaciones y medicamentos para el tratamiento de metástasis óseas y de otras enfermedades óseas. También se refiere a métodos de prevención y de tratamiento.

[0002] Los bisfosfonatos son análogos sintéticos del pirofosfato (estructura P-O-P) en los que el átomo de oxígeno central está sustituido por un átomo de carbono. Su estructura química puede ser representada por la siguiente fórmula:



[0003] Los bisfosfonatos pueden clasificarse en dos categorías.

15 **[0004]** La primera categoría comprende los compuestos de "primera generación" que no contienen un átomo de nitrógeno en sus cadenas laterales R¹ y R². Esta categoría comprende, en particular, el etidronato, el clodronato y el tiludronato.

20 **[0005]** La categoría secundaria comprende los compuestos de "segunda generación" y de "tercera generación" que contienen uno o más átomos de nitrógeno en una de sus cadenas laterales R¹ o R². Los de segunda generación comprenden una cadena lateral alifática portadora de un átomo de nitrógeno o de un grupo NH₂ terminal. Deberían mencionarse el pamidronato, el alendronato, el ibandronato y el neridronato. Los de tercera generación portan un núcleo heterocíclico que contiene un átomo de nitrógeno. Deberían mencionarse el risedronato y el zoledronato (núcleo de imidazol).

25 **[0006]** Esta clasificación en primera, segunda y tercera generación es ampliamente conocida por los expertos en la materia. Como ilustración, se mencionará T. Yuasa y col., Current Medical Chemistry 2007, 14: 2126 - 2135 y Selvaggi y col., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2005, 56 (3): 365 - 378; V. Stresing y col., Cancer Letters 2007, 257: 16 - 35; R. Graham G. Russell y col., Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007, 1117: 209 - 257.

30 **[0007]** Las metástasis óseas son habituales en los casos de cáncer avanzado. Son más habituales en el mieloma múltiple, el cáncer de mama y el cáncer de próstata, pero también están presentes en el caso del melanoma y en el caso del cáncer de vejiga, el cáncer de pulmón y el cáncer de riñón.

35 **[0008]** Los bisfosfonatos se han vuelto esenciales en el tratamiento terapéutico de los pacientes que padecen cáncer óseo. Así se usan el clodronato, el pamidronato, el zoledronato y el ibandronato.

40 **[0009]** Los bisfosfonatos pueden ser, sin embargo, tóxicos a dosis altas. También pueden estar sometidos a una considerable eliminación renal. Por ejemplo, para el zoledronato, esta eliminación a través de los riñones genera una toxicidad renal tal que las dosis usadas clínicamente en seres humanos deben ser cuidadosamente supervisadas y pueden resultar ser inferiores a las dosis eficaces para el tratamiento de metástasis óseas. Por lo tanto, las dosis clínicas de zoledronato son entre 10 y 40 veces menores que las dosis eficaces determinadas en animales (J. Green, Oncologist 2004, 9: 3 - 13).

45 **[0010]** L. Rossi y col. (Journal of Drug Targeting, febrero de 2005, 13 (2): 99 - 111) describen la encapsulación de clodronato en glóbulos rojos, y el uso de los mismos para la depleción de los macrófagos. También describen el tratamiento de los glóbulos rojos con ZnCl₂ y BS3, en presencia de etanolamina y de albúmina sérica bovina. Los autores demuestran una depleción de los macrófagos del bazo en ratones. El estudio ni aborda ni contempla el uso de glóbulos rojos como vectores de bisfosfonato en aplicaciones óseas.

50 **[0011]** K. Hiraoka y col. (documento WO2008016172) describen el uso de clodronato encapsulado en liposomas como un agente para la inhibición de la metástasis ósea y/o de la metástasis muscular. El documento CN1771972 también desvela liposomas y clodronato para su uso en el tratamiento de metástasis óseas. L. Rossi y col. (Transplantation, 2008, 85, 4: 648 - 650) describen que el clodronato encapsulado en glóbulos rojos prolonga la

supervivencia del aloinjerto de islotes en ratones diabéticos.

[0012] El objetivo de la invención es por lo tanto proponer una solución para la administración de los bisfosfonatos a nivel de la médula ósea, limitando por tanto la eliminación renal y evitando los problemas de toxicidad que actualmente limitan la eficacia de estos principios activos, de acuerdo con la reivindicación 1.

[0013] Un objetivo de la invención es también proponer una solución tal que hace posible un aumento de la biodisponibilidad de los bisfosfonatos a nivel de la médula ósea.

10 **[0014]** Un objetivo de la invención es también proponer una solución tal que hace posible una disminución en la cantidad de bisfosfonato administrado para un tratamiento dado y en comparación con la forma libre.

[0015] Un objetivo de la invención es también proponer una solución tal que hace posible un aumento de la dosis administrable, sin experimentar los limitantes problemas de toxicidad forma libre.

15

[0016] Un asunto de la invención es por lo tanto una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para su uso como un medicamento dirigido a la médula ósea y para llevar el bisfosfonato a esta médula ósea, limitando o incluso eliminando cualquier riesgo toxicidad, en particular de toxicidad renal.

20 **[0017]** Un asunto de la invención es también una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para su uso como un portador para llevar un bisfosfonato a la médula ósea, en particular para el tratamiento o la prevención de enfermedades óseas enfermedades tales como las metástasis óseas.

25 **[0018]** Por definición, el término "bisfosfonato" engloba todos los bisfosfonatos, y las sales y derivados de los mismos, y en particular los bisfosfonatos de primera, de segunda y de tercera generación, y las sales y derivados de los mismos. Este término engloba por tanto los difosfonatos, los ácidos bifosfónicos y los ácidos difosfónicos.

30 **[0019]** Algunos ejemplos no limitantes de bisfosfonatos incluyen: etidronato, clodronato, tiludronato, pamidronato, en particular, la forma disódica, alendronato, incadronato, ibandronato, neridronato, risedronato y zoledronato.

[0020] Preferiblemente, la invención usa bisfosfonatos que contienen al menos un átomo de nitrógeno, por ejemplo, bisfosfonatos de segunda generación y de tercera generación. En particular se eligen: pamidronato, alendronato, ibandronato y neridronato para la segunda generación. Los de tercera generación portan un núcleo heterocíclico que contiene un átomo de nitrógeno. Deberían mencionarse el risedronato y el zoledronato (núcleo de imidazol).

40 **[0021]** La invención se refiere en particular a una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para su uso como un medicamento para la prevención y el tratamiento de las patologías óseas y de médula ósea en las que puedan estar indicados los bisfosfonatos. Hace posible proporcionar dosis optimizadas para el tratamiento de la patología objetivo, en tanto que el protocolo de tratamiento ya no está limitado por la toxicidad asociada con la forma libre del bisfosfonato.

45 **[0022]** Por lo tanto, el uso puede estar relacionado con la prevención o el tratamiento de las metástasis óseas, de la hipercalcemia maligna, de la enfermedad de Paget y de la osteoporosis.

[0023] La invención es más particularmente una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para su uso como un medicamento para la prevención y el tratamiento de las metástasis óseas.

50 **[0024]** La invención también se refiere a un medicamento que contiene una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para su uso para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades óseas o de médula ósea, y en particular de metástasis óseas.

[0025] La invención también se refiere al uso de una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para la preparación de un medicamento para su uso en la prevención y el tratamiento de estas enfermedades óseas o de médula ósea, y en particular de las metástasis óseas.

[0026] La invención también se refiere a una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato, para su uso como un portador para llevar un bisfosfonato a la médula ósea, para el tratamiento o la prevención de

las metástasis óseas.

[0027] Preferiblemente, la encapsulación del bisfosfonato se realiza mediante un procedimiento denominado de lisis-resellado.

5

[0028] El bisfosfonato se prepara generalmente en una solución tamponada, por ejemplo, en PBS, a un pH de entre 7,2 y 7,6, preferiblemente de 7,4.

[0029] De acuerdo con una característica de este procedimiento, la lisis de los glóbulos rojos se lleva a cabo en primer lugar sometiendo estos últimos a unas condiciones hipotónicas. Los glóbulos rojos se hinchan, abriendo los poros. Después se añade el bisfosfonato y penetra en el interior de los glóbulos rojos. Preferiblemente, se añade gradualmente una solución de bisfosfonato, y después la mezcla se deja en incubación durante, por ejemplo, entre 10 y 60 minutos, normalmente aproximadamente 30 minutos. A continuación se restablecen las condiciones isotónicas y los poros, por lo tanto, se sellan o se cierran de nuevo, de forma que los glóbulos rojos encapsulan de forma estable el bisfosfonato.

10

15

[0030] De acuerdo con la invención, los glóbulos rojos se tratan con un agente químico en unas condiciones que promuevan su direccionamiento a la médula ósea. Este agente químico promueve el reconocimiento por las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) de la médula ósea.

20

[0031] El tratamiento químico se realiza sobre los glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato.

[0032] Un agente químico preferido que es compatible con su uso clínico en seres humanos es el suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (abreviado como BS3 o BS³; CAS 82436-77-9). Ventajosamente se usa una solución de este agente.

25

[0033] Un asunto de la invención es también una suspensión de glóbulos rojos, o un medicamento que comprende dicha suspensión, que comprende glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato y cuya membrana ha sido tratada con objeto de promover su reconocimiento por parte de las células fagocíticas de la médula ósea, mediante el uso de un agente químico, preferiblemente BS3. Preferiblemente, el BS3 se usa solo, con la exclusión de cualquier otro agente químico o biológico, tal como ZnCl₂. De acuerdo con una primera forma de realización, el bisfosfonato es un bisfosfonato de primera generación. De acuerdo con una segunda forma de realización, el bisfosfonato es un bisfosfonato de segunda generación. De acuerdo con una tercera forma de realización, el bisfosfonato es un bisfosfonato de tercera generación. Algunos ejemplos no limitantes de bisfosfonatos incluyen: etidronato, clodronato, tiludronato, pamidronato, en particular la forma disódica, alendronato, incadronato, ibandronato, neridronato, risedronato y zoledronato. De acuerdo con una forma de realización, el bisfosfonato se elige de entre: etidronato, tiludronato, pamidronato, en particular la forma disódica, alendronato, incadronato, ibandronato, neridronato, risedronato y zoledronato.

30

35

[0034] De acuerdo con una característica del método de tratamiento con BS3, la suspensión de glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato se pone en contacto con el BS3 durante un periodo de tiempo adecuado, que puede ser, en particular, de entre aproximadamente 10 min y aproximadamente 1 hora. Este periodo de tiempo es ventajosamente de entre aproximadamente 15 min y aproximadamente 45 min, preferiblemente de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 min, normalmente del orden de 30 min.

40

[0035] De acuerdo con otra característica del método de tratamiento con BS3, esta incubación se lleva a cabo preferiblemente a la temperatura ambiente, en particular a entre 18 y 25 °C.

[0036] De acuerdo con otra característica del método de tratamiento con BS3, la suspensión de glóbulos rojos que contiene el bisfosfonato se lava previamente con un tampón adecuado, por ejemplo, PBS.

50

[0037] De acuerdo con otra característica, la suspensión de glóbulos rojos tratada con BS3 se lleva hasta una concentración de entre aproximadamente 0,5 x 10⁶ y aproximadamente 5 x 10⁶ células/μl, normalmente de entre aproximadamente 1 x 10⁶ y aproximadamente 3 x 10⁶ células/μl, antes de ponerla en contacto con la solución de BS3.

55

[0038] De acuerdo con otra característica, se usa una solución de BS3 para obtener una concentración final de BS3 de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 6 mM, preferiblemente de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 mM, normalmente de aproximadamente 1 mM en la suspensión. En particular puede usarse una

solución de BS3 aproximadamente 2 mM. Preferiblemente se usa una solución tamponada de BS3, que preferiblemente contiene glucosa y tampón de fosfato, para obtener la concentración final deseada de BS3, en particular de aproximadamente 1 mM. De acuerdo con una característica, la solución tamponada de BS3 está ventajosamente a un pH de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,6, preferiblemente a un pH de 5 aproximadamente 7,4. De acuerdo con otra característica, la solución tamponada de BS3 tiene una osmolaridad de entre aproximadamente 280 y aproximadamente 320 mOsm.

10 **[0039]** La incubación puede detenerse mediante el uso de un agente tal como Tris-HCl, y después se centrifuga la mezcla, y las células se lavan y se resuspenden en un tampón adecuado; tal como SAG-BSA. La mezcla se deja en incubación antes de la centrifugación durante unos pocos minutos, en particular entre 1 y 10 minutos, a la temperatura ambiente.

[0040] La suspensión puede estar lista para su uso y puede tener un hematocrito adecuado para ser administrada sin dilución.

15 **[0041]** También puede estar envasada de tal forma que tenga que ser diluida antes de su administración.

[0042] De acuerdo con la invención, el hematocrito de la suspensión lista para su uso es ventajosamente de entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 70 %, preferiblemente de entre aproximadamente el 45 % y 20 aproximadamente el 55 %, mejor aún de aproximadamente el 50 %.

[0043] En su forma para dilución, el hematocrito puede ser elevado, en particular de entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 90 %.

25 **[0044]** La suspensión se envasa preferiblemente en un volumen de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 250 ml. El envase es preferiblemente una bolsa de sangre del tipo adecuado para una transfusión sanguínea. La cantidad encapsulada de bisfosfonato correspondiente a la prescripción médica está contenida preferiblemente totalmente en la bolsa de sangre.

30 **[0045]** Por ejemplo, la suspensión correspondiente a una dosis, por ejemplo, una bolsa de sangre, comprende entre 1 y 40 mg de bisfosfonato, en particular entre 2 y 10 mg.

35 **[0046]** De acuerdo con una característica de la invención, los glóbulos rojos que se van a administrar están en suspensión en una solución salina farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, el medio habitual para los glóbulos rojos, en particular, una solución que contiene NaCl y uno o más ingredientes elegidos de entre glucosa, dextrosa, adenina y manitol; por ejemplo, SAG-manitol o ADSol). Esta solución es capaz de conservar los glóbulos rojos, y puede incluir también un aditivo conservante, tal como L-carnitina.

40 **[0047]** El asunto de la invención es por tanto un método para la prevención o el tratamiento de las metástasis óseas o de otras enfermedades óseas. Este método comprende la administración al paciente de una formulación o de un medicamento de acuerdo con la invención.

45 **[0048]** De acuerdo con la invención, la administración de la formulación o del medicamento se realiza mediante una inyección intravenosa o intraarterial, y preferiblemente mediante goteo desde una bolsa de o similares. La administración se lleva a cabo normalmente por vía intravenosa en el brazo o a través de un catéter central.

[0049] En particular se administran desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 250 ml de formulación (una dosis) de acuerdo con la invención. A partir de 50 ml o más, se prefiere el uso de un goteo.

50 **[0050]** Un tratamiento comprende la administración de una dosis o de varias dosis de acuerdo con el protocolo decidido. Dicho protocolo puede proporcionar varias administraciones con una frecuencia mensual, bimestral, trimestral, semestral o anual, durante el periodo de tratamiento recomendado.

55 **[0051]** Las técnicas para la encapsulación de principios activos en glóbulos rojos son conocidas, y la técnica básica es mediante lisis-resellado, que es preferida en el presente documento, se describe en las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101, a las que pueden referirse los expertos en la materia. De acuerdo con esta técnica, en el compartimento primario de un elemento de diálisis (por ejemplo, una bolsa de diálisis o un cartucho de diálisis) se administra de forma continua una suspensión de glóbulos rojos, mientras que el segundo compartimento contiene una solución acuosa que es hipotónica con respecto a la suspensión de glóbulos rojos, con objeto de lisar estos

últimos; a continuación, en una unidad de resellado, se induce el resellado de los glóbulos rojos en presencia del bisfosfonato, mediante un aumento de la presión osmótica y/o de la presión oncótica, y después se recupera una suspensión de glóbulos rojos que contiene el bisfosfonato. De acuerdo con una característica de la invención, se prefiere llevar a cabo la lisis de una suspensión de glóbulos rojos que ya contiene el bisfosfonato que se va a encapsular.

[0052] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato pueden obtenerse en particular mediante el siguiente método, que también es un asunto de la invención:

10 - suspensión de un sedimento de glóbulos rojos en una solución isotónica a un nivel de hematocrito mayor o igual al 65 %, enfriando a entre + 1 y + 8 °C,

- procedimiento de lisis, a una temperatura mantenida constantemente a entre + 1 y + 8 °C, que comprende el paso de la suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito mayor o igual al 65 % y de una solución de lisis hipotónica enfriada a entre + 1 y + 8 °C, en una bolsa de diálisis o en un cartucho de diálisis (se prefiere el cartucho),

15 - procedimiento de encapsulación mediante la adición, preferiblemente gradual, de una solución de bisfosfonato a la suspensión lisada, a una temperatura mantenida a entre + 1 y + 8 °C, preferiblemente durante un periodo de incubación en particular de entre 10 y 60 min, normalmente de aproximadamente 30 min, y

20 - procedimiento de resellado llevado a cabo en presencia de una solución hipertónica a una temperatura mayor, en particular a entre + 30 y + 42 °C.

[0053] Como una variante preferida, puede obtenerse una inspiración a partir del método descrito en el documento WO-A-2006/016247, que hace posible una encapsulación eficaz del bisfosfonato, de una forma reproducible, segura y estable. La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato puede obtenerse entonces a partir del siguiente método, que también es un asunto de la invención:

25 - suspensión de un sedimento de glóbulos rojos en una solución isotónica a un nivel de hematocrito mayor o igual al 65 %, enfriando a entre + 1 y + 8 °C,

30 - medición de la fragilidad osmótica mediante el uso de una muestra de glóbulos rojos procedente de este mismo sedimento de glóbulos rojos, siendo posible llevar a cabo las etapas 1 y 2 en cualquier orden (incluyendo en paralelo),

35 - procedimiento de lisis, en particular en el interior de la misma cámara, a una temperatura mantenida constantemente a entre + 1 y + 8 °C, que comprende el paso de la suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito mayor o igual al 65 % y de una solución de lisis hipotónica enfriada a entre + 1 y + 8 °C, en una bolsa de diálisis o en un cartucho de diálisis (se prefiere el cartucho; siendo ajustados los parámetros de la lisis en función de la fragilidad osmótica medida previamente, y

40 - procedimiento de encapsulación mediante la adición, preferiblemente gradual, de una solución de bisfosfonato a la suspensión lisada, a una temperatura mantenida a entre + 1 y + 8 °C, durante un periodo de incubación en particular de entre 10 y 60 min, normalmente de aproximadamente 30 min, y

45 - procedimiento de resellado llevado a cabo en una segunda cámara en presencia de una solución hipertónica a una temperatura mayor, en particular a entre + 30 y + 42 °C.

[0054] El término "internalización" pretende indicar la penetración del bisfosfonato en el interior de los glóbulos rojos.

[0055] En particular, para la diálisis, el sedimento de glóbulos rojos se suspende en una solución isotónica a un nivel de hematocrito mayor o igual al 65 %, y preferiblemente mayor o igual al 70 % y esta suspensión se enfría hasta entre + 1 y + 8 °C, preferiblemente hasta entre + 2 y + 6 °C, normalmente alrededor de + 4 °C. De acuerdo con una forma de realización en particular, el nivel de hematocrito es de entre el 65 % y el 80 %, preferiblemente de entre el 70 % y el 80 %.

[0056] Cuando se mide, la fragilidad osmótica se mide ventajosamente en los glóbulos rojos justo antes de la etapa de lisis, en presencia o en ausencia de bisfosfonato en la suspensión. Los glóbulos rojos o la suspensión que

los contiene están ventajosamente a una temperatura cercana o idéntica a la temperatura elegida para la lisis. De acuerdo con una característica ventajosa de la invención, la medición llevada a cabo de la fragilidad plasmática se explota rápidamente, es decir, el procedimiento de lisis se realiza poco después de haber sido tomada la muestra. Preferiblemente, este período de tiempo entre la recogida de la muestra y el inicio de la lisis es menor o igual 30 minutos, incluso mejor aún menor o igual a 25 e incluso menor o igual a 20 minutos.

10 **[0057]** Con respecto a la forma en la que se lleva a cabo el procedimiento de lisis-resellado, habiendo medido la fragilidad osmótica y habiendo sido tenida en cuenta, los expertos en la materia pueden referirse al documento WO-A-2006/016247 para los detalles adicionales. Este documento está incorporado en el presente documento como referencia.

[0058] La presente invención se describirá ahora en con mayor detalle mediante las formas de realización tomadas como ejemplos no limitantes.

15 **I - Ejemplo 1: método para la encapsulación de zoledronato en glóbulos rojos murinos y humanos**

Ia - Material:

20 **[0059]** Para la diálisis: cartucho de diálisis (fibras Gambro 280)

[0060] Ensayo: el ensayo del zoledronato en los glóbulos rojos se lleva a cabo mediante una cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, después de la preparación de las muestras de acuerdo con el siguiente método. Los GR que encapsulan el zoledronato se lisan con 2,5 volúmenes de agua, y después se extrae el zoledronato mediante la precipitación de las proteínas y de las membranas con ácido tricloroacético al 12 %.

25 **[0061]** Los GR (antes de la encapsulación), los productos finales GR-Zol y GR-LR tratados o no tratados con BS3, y también los sobrenadantes de los mismos en el D0 y en el D1, se ensayan con objeto de estimar la cantidad de zoledronato que ha sido encapsulada.

30 **[0062]** Con objeto de mejorar el tiempo de retención del zoledronato en el soporte C18, se usa el compuesto hidrogenosulfato de tetrabutilamonio como agente de emparejamiento iónico.

35	Instrumento:	Shimadzu UFLC
	Columna:	Gemini C18 5 μ 110A de 250 x 4,6 mm de DI
	Temperatura:	40 °C
	Volumen de inyección:	40 μ l
	Detección UV:	220 nm
	Caudal:	0,7 ml/min
40	Fase móvil A:	K ₂ HPO ₄ 8 mM - (1,39 g/l), Na ₂ HPO ₄ 2 mM - (0,1 g/l), hidrogenosulfato de tetrabutilamonio 7 mM - (2,7 g/l)
	Fase móvil B:	Metanol

Ib - Método:

45 **[0063]** Los glóbulos rojos se centrifugan y después se lavan tres veces con PBS. El hematocrito de la suspensión se lleva hasta el 70 % con PBS antes de comenzar la diálisis. Los GR se dializan a un caudal de 2 ml/min frente a un tampón de lisis de baja osmolaridad (contraflujo a 15 ml/min). Los GR lisados que abandonan la columna se dividen en dos volúmenes iguales. Gradualmente (diez veces) se añade la solución de Zometa® (0,8 mg/ml de ácido zoledrónico) a uno de los volúmenes de los glóbulos rojos dializados, hasta alcanzar una
50 concentración final de 0,4 mg/ml.

[0064] Como control, el otro volumen de glóbulos rojos dializados se diluye con un volumen de PBS, añadido gradualmente. Las dos suspensiones se incuban durante 30 minutos a 4 - 8 °C.

55 **[0065]** Los glóbulos rojos se resellan mediante la adición de una solución de alta osmolaridad (0,1 volumen) y una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Las células reselladas se lavan tres veces con PBS que contiene glucosa. Las suspensiones se llevan hasta un hematocrito del 50 %, bien con SAG-manitol complementado o no complementado con BSA (al 6 %), o con PBS que contiene glucosa, o bien se almacenan directamente a un hematocrito elevado (al 80 %) de forma que constituyan los productos finales GR-Zol (zoledronato) y GR-LR (control

lisado-resellado sin zoledronato).

II - Ejemplo 2: tratamiento químico con suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS³) de los glóbulos rojos que contienen zoledronato

5

[0066] La suspensión de glóbulos rojos que contienen zoledronato se obtiene según se ha descrito en el Ejemplo 1. Esta suspensión se lava varias veces antes de ser diluida hasta $1,7 \times 10^6$ células/ μ l, y después se pone en contacto con una solución 2 mM de BS³ que contiene tampón de fosfato 50 mM, a pH 7,4, y glucosa al 0,09 %, de forma que se obtenga una concentración final de BS³ de 1 mM. Los glóbulos rojos se incuban durante 30 minutos a la temperatura ambiente, y después se detiene la reacción mediante la adición de un volumen de Tris 20 mM, NaCl 140 mM. Después de una centrifugación durante 5 minutos, los glóbulos rojos se lavan una vez con PBS que contiene glucosa, y después una vez con SAG-manitol complementado o no complementado con BSA (al 6 %). Los glóbulos rojos se llevan hasta un hematocrito del 50 % en SAG-manitol complementado o no complementado con BSA (al 6 %), o PBS que contiene glucosa, o bien se almacenan directamente a un hematocrito elevado (al 80 %).

10

15

III - Resultados para los Ejemplos 1 y 2:

a) Encapsulaciones en GR humanos

20 **[0067]** Las siguientes tablas proporcionan una recapitulación de los 4 experimentos de encapsulación de Zometa® llevados a cabo con glóbulos rojos humanos (bolsa de concentrado de GR).

[0068] Los datos celulares (Tabla 1) obtenidos tras el análisis de los productos finales GR-Zol en el D1 demuestran que los GR cargados mantienen unas características celulares cercanas a las de los GR de la bolsa y no experimentan ningún daño en particular.

25

Tabla 1:

Datos celulares relativos a los glóbulos rojos humanos (en el D1)						
Experimento	Tratamiento	Medio de almacenamiento	MCV (μ m ³)	Hemoglobina extracelular (g/dl)	MCHC (g/dl)	Rendimiento celular
1	-	PBS que contiene glucosa	87	0,81	25,5	-
2	-	SAG-manitol	83	1,49	26,9	76,50 %
3	-	PBS que contiene glucosa	80	0,69	28,8	78,00 %
4	BS3 1 mM	SAG-manitol	84	1,17	28,1	58,00 %

30 **[0069]** Las concentraciones corpusculares de hemoglobina (MCHC) siguen siendo satisfactorias, con unos valores mayores de 25 g/dl. Esto atestigua una pequeña pérdida del contenido intraeritrocitario durante el método. La hemoglobina extracelular es menor de 2 g/dl, los productos finales obtenidos son por lo tanto de calidad inyectable. El rendimiento para el grupo con BS3 1 mM genera una pérdida celular del 17 %. Sin embargo, los rendimientos celulares globales de los productos finales son todos compatibles con una producción industrial (> 55 %).

35

[0070] El proceso de diálisis da como resultado una disminución en el volumen corpuscular medio (MCV) de los glóbulos rojos GR-Zol ($80 - 88 \mu$ m³) en comparación con los glóbulos rojos de la bolsa (97μ m³).

40 **[0071]** Los datos relativos a la encapsulación del zoledronato se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2

Datos relativos a la encapsulación del zoledronato (en el D1)						
Exp.	Hematocrito durante el almacenamiento a 4 °C	Medio de almacenamiento	Zoledronato dosificado (mg/μl)	Zoledronato intracelular (%)	Zoledronato extracelular (%)	Rendimiento de incorporación (%)
1	50 %	PBS que contiene glucosa	54,3	68	32	23
2	50 %	SAG-manitol	66,2	83	17	33,6
3	80 %	PBS que contiene glucosa	69,5	83	17	35,5
4	50 %	SAG-manitol	56,1	71	29	24,5

5 **[0072]** El zoledronato tiene un tamaño crítico para su encapsulación en los GR y el criterio más importante a observar es la cantidad de compuesto encapsulada en lo GR en el D1 en comparación con la proporción extracelular. Se llevaron a cabo tres experimentos sin un tratamiento particular de las membranas de los eritrocitos, y los resultados muestran una encapsulación satisfactoria del zoledronato en el D1 (se ha encapsulado desde un 68 % hasta un 83 % del zoledronato en los GR en el producto final). Con el tratamiento con BS3, la encapsulación es del 71 %.

10

[0073] La Tabla 3 muestra los datos relativos a la estabilidad de los glóbulos rojos humanos que contienen zoledronato. En el día de la producción (D0) y al día siguiente (D1), se miden la hemoglobina extracelular, el hematocrito de las suspensiones y las cantidades de zoledronato intracelular y extracelular.

Experimento	Medio	Zol. extracelular en el D0 (%)	Zol. extracelular en el D1 (%)	Hb extracelular en el D0 (g/dl)	Hb extracelular en el D1 (g/dl)	Hematocrito en el D0 (%) en el D1 (%)	Rendimiento de hematocrito (%)	
1	PBS que contiene glucosa	13	32	0,30	0,81	49,4	47,8	96,76 %
2	SAG-manitol	13	17	0,45	1,49	50,0	48,4	96,80 %
4	SAG-manitol	16	29	0,26	1,17	51,1	49,5	96,87 %

[0074] Se observa un aumento en el zoledronato extracelular entre el D0 y el D1. Esto puede correlacionarse con la hemoglobina extracelular, que aumenta entre el D0 y el D1, y también con la pérdida celular (rendimiento de hematocrito). La liberación del zoledronato en el medio extracelular procede por tanto esencialmente de la ruptura de los glóbulos rojos que no han sido adecuadamente resellados después de la diálisis, y no de una fuga activa o pasiva a través de la membrana del glóbulo rojo. Los resultados muestran un buen almacenamiento en las diversas condiciones.

b) Encapsulaciones en GR murinos

10 **[0075]** La siguiente tabla proporciona una recapitulación de los 3 experimentos de encapsulación de Zometa® llevados a cabo con glóbulos rojos murinos (sangre completa). Al igual que para los GR humanos, los GR-Zol conservan unas características celulares cercanas a las de la sangre completa.

Tabla 4

15

Datos relativos a los glóbulos rojos murinos (en el D1)					
Experimento	Tratamiento	MCV (μm^3)	Hemoglobina extracelular (g/dl)	Fragilidad osmótica (g/l)	MCHC (g/dl)
5	BS3 1 mM	43	1,99	1,67	32,2
6	-	46	3,38	1,47	26,7
7	BS3 1 mM	43	2	-	31,5

[0076] Las concentraciones corpusculares de hemoglobina (MCHC) son muy satisfactorias. La hemoglobina extracelular es mayor que en el caso de los GR humanos, puesto que los glóbulos rojos de ratón son más frágiles. El proceso de diálisis da como resultado un volumen corpuscular medio de los glóbulos rojos GR-Zol ($43 - 46 \mu\text{m}^3$) que es homogéneo entre un experimento y otro.

20

[0077] La Tabla 5 muestra los datos relativos a la encapsulación de zoledronato en GR murinos (medición en el D1). La suspensión final es una suspensión concentrada con un hematocrito del 80 %.

25

Tabla 5

Datos relativos a la encapsulación de zoledronato (GR murinos) (D1)					
Experimento	Tratamiento	Zoledronato dosificado ($\mu\text{g/ml}$)	Zoledronato intracelular (%)	Zoledronato extracelular (%)	Rendimiento de incorporación (%)
11	BS3 1 mM	55,7	92	8	28
12	-	79,8	70	30	30
13	BS3 1 mM	55,1	78	22	24

[0078] Los resultados muestran una encapsulación satisfactoria en el D1.

30 **V - Ejemplo 3: validación del direccionamiento a la médula ósea con el tratamiento con BS³:**

[0079] El fluorocromo FITC-dextrano (70 kDa) fue encapsulado en glóbulos rojos murinos (ratones OF1) mediante el método de diálisis hipotónica en una columna. La sangre se centrifuga previamente y después se lava tres veces con PBS. El hematocrito se lleva hasta el 70 % en presencia de FITC-dextrano, añadido a una concentración final de 8 mg/ml, antes del inicio de la diálisis. Los GR se dializan a un caudal de 2 ml/min frente a un tampón de lisis de baja osmolaridad (contraflujo a 15 ml/min). Los GR lisados que abandonan la columna son resellados mediante la adición de una solución de alta osmolaridad y su incubación durante 30 minutos a 37 °C. Después de dos lavados con PBS que contiene glucosa, los GR se diluyen hasta $1,7 \times 10^6$ células/ μl , antes de ponerlos en contacto con una solución 10 mM de BS³ que contiene tampón de fosfato 50 mM, a pH 7,4, y glucosa al 0,09 %. Los GR se incuban durante 30 minutos a la temperatura ambiente, y la reacción se detiene después mediante la adición de un volumen de Tris 20 mM, NaCl 140 mM. Después de una centrifugación durante 5 minutos, los GR se lavan una vez con PBS que contiene glucosa, y después una vez con SAG-manitol complementado con BSA (al 6 %). Los glóbulos rojos se llevan hasta un hematocrito del 50 % de forma que constituyan el producto final, que es inyectado en el ratón en el D1. El ratón es sacrificado 1 h 30 después de la inyección, y después la médula

35

40

ósea aislada a partir de los fémures se coloca en Tissue-Tek para su congelación en nitrógeno. Se cortan secciones de criostato de 10 µm para un análisis inmunohistoquímico. Después de una fijación en acetona, se lleva a cabo un marcaje doble, que muestra el FITC (DAB, marrón) y los macrófagos F4/80 (nueva fuchina, rojo).

5 **[0080]** La observación de las secciones bajo un microscopio muestra la localización conjunta de los macrófagos y del dextrano. La observación confirma la incorporación del dextrano por parte de los macrófagos a través de una fagocitosis de los glóbulos rojos.

[0081] El análisis mediante citometría de flujo (FC500 Beckman Coulter) proporciona la siguiente información.

10

Tabla 6: porcentaje de células fluorescentes en la médula ósea 1 h 30 después de la inyección intravenosa de los GR en los ratones

Tratamientos	Número de células fluorescentes totales
GR-Dextrano	5,3 %
GR-Dextran-BS3	7,4 %

15 **[0082]** El análisis mediante citometría de flujo muestra que, 1 h 30 después de la inyección, aproximadamente el 7 % y el 5 % de las células de la médula ósea son fluorescentes en el caso del tratamiento con BS3 y en el caso no tratado.

20 **[0083]** La Tabla 7 la muestra el porcentaje de células fagocíticas que han fagocitado glóbulos rojos tratados o sin tratar.

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

25 **[0084]** El tratamiento con BS3 induce una captación más rápida y mayor, mediante fagocitosis, de los GR en la médula ósea que en ausencia de tratamiento.

Conclusiones

[0085]

- 30
- El Zoledronato puede ser encapsulado de forma estable en los GR, cuya membrana puede haber sido tratada o no con BS3.
 - Las cantidades encapsuladas son ampliamente compatibles con las cantidades usadas clínicamente. Los experimentos de encapsulación (con un tratamiento con BS3 1 mM) mostraron que se obtuvieron unos productos finales que contienen 56,1 µ/ml de zoledronato. Por lo tanto, sería necesario administrar a una persona
- 35 una infusión de aproximadamente 71 ml de GR-Zol con objeto de obtener el equivalente de 4 mg.
- El tratamiento con BS3 1 mM hace posible dirigir las células de la médula ósea.

40 **[0086]** Todo esto valida el uso de los GR como portadores de zoledronato para su direccionamiento a la médula ósea en el contexto de metástasis óseas o de otras enfermedades óseas.

REIVINDICACIONES

1. Suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un bisfosfonato de segunda generación o de tercera generación, en la que los glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato han experimentado un tratamiento químico con un agente químico para promover el direccionamiento de la médula ósea, para su uso como un medicamento para la prevención y el tratamiento de las metástasis óseas.
2. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el tratamiento químico se lleva a cabo con una solución de suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3).
3. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con la Reivindicación 2, en la que la suspensión de glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato se pone en contacto con el BS3 durante un periodo de tiempo de entre 10 min y 1 hora, en particular de entre 15 min y 45 min, preferiblemente de entre 20 y 40 min, normalmente del orden de 30 min.
4. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con la Reivindicación 2 o 3, en la que la incubación con el BS3 es a la temperatura ambiente.
5. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con una de las Reivindicaciones 2 a 4, en la que, antes de la incubación con el BS3, la suspensión de glóbulos rojos que contiene el bisfosfonato se lava con un tampón adecuado, preferiblemente PBS.
6. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con una de las Reivindicaciones 2 a 5, en la que la suspensión de glóbulos rojos que encapsulan el bisfosfonato se lleva hasta una concentración de entre $0,5 \times 10^6$ y 5×10^6 células/ μ l, preferiblemente de entre 1×10^6 y 3×10^6 células/ μ l, antes de ponerla en contacto con la solución de BS3.
7. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con una de las Reivindicaciones 2 a 6, en la que se usa una solución de BS3 para obtener una concentración final de BS3 en la suspensión de entre 0,1 y 6 mM, preferiblemente de entre 0,5 y 3 mM, aun todavía mejor de aproximadamente 1 mM.
8. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con una de las Reivindicaciones 2 a 7, en la que se usa una solución tamponada de BS3 que tiene una osmolaridad de entre 280 y 320 mOsm y un pH de entre 7,2 y 7,6, preferiblemente de 7,4.
9. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con la Reivindicación 8, en la que la solución de BS3 comprende glucosa y tampón de fosfato.
10. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el bisfosfonato se elige de entre: pamidronato, en particular la forma disódica, alendronato, incadronato, ibandronato, neridronato, risedronato y zoledronato.
11. Suspensión de glóbulos rojos de acuerdo con la Reivindicación 10, en la que el bisfosfonato es zoledronato.