

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 295**

51 Int. Cl.:

A61K 35/18 (2015.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2012 PCT/GB2012/052157**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2012 E 12756551 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2760459**

54 Título: **Tratamiento de la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)**

30 Prioridad:

28.09.2011 GB 201116767

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

13.06.2018

73 Titular/es:

**ST. GEORGE'S HOSPITAL MEDICAL SCHOOL
(100.0%)
Cranmer Terrace Tooting
London SW17 0RE, GB**

72 Inventor/es:

**BAX, BRIDGET y
BAIN, MURRAY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 672 295 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).

Tratamiento de la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)

Descripción

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a eritrocitos autólogos para uso en el tratamiento de encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE).

10 Antecedentes de la invención

Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial

15 [0002] Encefalomiopatía mitocondrial neurogastrointestinal (MNGIE, herencia mendeliana en Man nº 603041, base de datos de genoma de acceso nº 9835128) es un trastorno metabólico hereditario mortal causado por mutaciones en un gen nuclear que controlan la replicación y expresión del genoma mitocondrial (Nishino et al., 1999; Hirano et al., 2004). En el pasado, el trastorno también se conoce como:

- 20 • polineuropatía, oftalmoplejía, leucoencefalopatía y pseudoobstrucción intestinal (POLIP);
- encefalopatía mioneurogastrointestinal (MNGIE);
- distrofia muscular oculogastrointestinal (OGIMD);
- síndrome de encefalopatía mitocondrial neurogastrointestinal;
- encefalomiopatía mitocondrial con polineuropatía sensitivomotora, oftalmoplejía y pseudoobstrucción (ME-POP);
- 25 • distrofia muscular oculogastrointestinal (OGIMD);
- deficiencia de fosforilasa de timidina; y
- síndrome de encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial.

30 [0003] En 1994 se propuso el nombre encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial, con el objetivo de preservar el acrónimo MNGIE, pero hacer hincapié en las anomalías mitocondriales que son centrales para el mecanismo patogénico de este trastorno (Hirano et al., 1994).

35 [0004] MNGIE es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo de nucleótidos causado por mutaciones en el gen nuclear TYMP (previamente conocido como ECGF1). Este gen codifica la fosforilasa de timidina (EC 2.4.2.4), la enzima requerida para el metabolismo normal de los desoxinucleótidos de pirimidina timidina y desoxiuridina (Hirano et al., 2004). Las mutaciones en el gen TYMP dan como resultado una ausencia total o parcial de la actividad de la fosforilasa de timidina, que conduce a una acumulación dramática de timidina y desoxiuridina en tejidos y fluidos corporales (Nishino et al., 1999; 2000; Hirano et al., 1994; Spinazzola et al. al., 2002; Marti et al., 2003; Valentino et al., 2007). Las elevadas concentraciones sistémicas de estos desoxinucleósidos se reflejan en concentraciones intracelulares elevadas de sus trifosfatos correspondientes. Esto perturba el equilibrio fisiológico de los cuatro trifosfatos de desoxinucleósidos dentro de la mitocondria, lo que interfiere con la replicación normal del mtADN, lo que lleva a supresiones múltiples, mutaciones puntuales somáticas y agotamiento del mtADN (Hirano et al., 1994; Marti et al., 2003; Nishigaki et al., 2003, 2004) y, en última instancia, fallo mitocondrial (Hirano et al., 1994; Spinazzola et al., 2002; Marti et al., 2003). ADNmt se codifica para polipéptidos, ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr) necesarios para la síntesis de enzimas implicadas en la fosforilación oxidativa. El fallo consiguiente de la producción de energía celular se cree que causa directamente la manifestación clínica central, la degeneración del sistema nervioso periférico.

50 [0005] Los pacientes con MNGIE suelen estar presentes durante la segunda década de la vida, aunque los pacientes se han presentado ya en cinco meses y todavía en la quinta década; la edad promedia es de 18,5 años (Nishino et al., 2001). Se cree que el inicio relativamente tardío se debe a la acumulación progresiva de defectos del ADN mitocondrial, y la enfermedad se hace evidente una vez que el número de mitocondrias afectadas alcanza un nivel umbral crítico. La enfermedad tiene una presentación clínica homogénea con síntomas gastrointestinales que incluyen saciedad precoz, náuseas, dolor abdominal crónico, diarrea y pérdida de peso. Estos síntomas son secundarios a la dismotilidad alimentaria causada por la degeneración del sistema nervioso periférico alimentario. Los pacientes generalmente tienen un habitus corporal delgado con masa muscular reducida, y puede desarrollar caquexia. Pueden ocurrir episodios de pseudoobstrucción intestinal franca. Algunos pacientes desarrollan una hepatopatía con esteatosis hepática y cirrosis. La oftalmoplejía externa progresiva y la polineuropatía sensitivomotora periférica son invariables. Este último afecta inicialmente a las extremidades inferiores. En la resonancia magnética (RM) hay, en la mayoría de los casos, un aumento difuso de la señal de T2 en la sustancia blanca profunda de los hemisferios cerebrales, pero esto suele ser asintomático (Hirano et al., 1994).

65 [0006] La biopsia muscular esquelética puede mostrar fibras rojas rasgadas (debido a la proliferación anormal de las mitocondrias en respuesta a la fosforilación oxidativa defectuosa), mitocondrias ultraestructuralmente anormales, y anomalías tanto de ADN mitocondrial (ADNmt) y actividades de enzimas de la cadena de transporte de

electrones mitocondriales en el análisis con enzimas (Papadimitriou y otros, 1998).

[0007] Los estudios bioquímicos pueden mostrar acidosis láctica, indicativa de un defecto de la fosforilación oxidativa. Los niveles de timidina plasmática y desoxiuridina se incrementan a $> 3 \mu\text{mo/l}$ y $5 \mu\text{mo/l}$, respectivamente, en comparación con niveles indetectables en controles sanos no afectados (Marti et al., 2003; 2004). Las concentraciones de timidina y desoxiuridina en la orina también se incrementan (Spinazzola et al., 2002). La actividad de la fosforilasa de timidina en leucocitos de pacientes con MNGIE se reduce drásticamente, mostrando poco ($<10\%$ de controles sanos no afectados) o ninguna actividad (Spinazzola et al., 2002; Marti et al., 2004).

[0008] La base molecular de MNGIE se ha determinado mediante amplificación por PCR y análisis de secuencias de ADN; se han identificado 52 mutaciones diferentes en el gen TYMP desde su primera descripción y no se ha informado ninguna predominante [La base de datos de mutaciones génicas humanas (HGMD) en el Institute of Medical Genetics en Cardiff]. La mayoría de estas mutaciones son erróneas o sin sentido, las otras son pequeñas deleciones, pequeñas inserciones y mutaciones del sitio de empalme. Los pacientes son homocigotos o compuestos heterocigotos para la mutación TYMP. Los portadores heterocigotos de mutaciones TYMP tienen del 26 al 35% de actividad residual de fosforilasa de timidina, son asintomáticos y tienen niveles indetectables de timidina y desoxiuridina en plasma (Nishino et al., 1999; Spinazzola et al., 2002).

[0009] MNGIE es una enfermedad degenerativa implacablemente progresiva con un mal pronóstico, y causa un gran sufrimiento a las personas afectadas. La dismotilidad gastrointestinal causada por la degeneración del sistema nervioso periférico alimentario ocurre en casi todos los pacientes. Los problemas digestivos resultantes incluyen saciedad precoz, problemas para tragar (disfagia), náuseas y vómitos después de comer, distensión abdominal y dolor episódico y diarrea. Estos problemas gastrointestinales conducen a una pérdida de peso severa y una masa muscular reducida. La discapacidad resulta de la neuropatía periférica; los pacientes experimentan debilidad de las extremidades inferiores, particularmente en manos y pies, entumecimiento y sensación de hormigueo. Otros síntomas incluyen ptosis (párpados caídos), oftalmoplejía (debilidad de los músculos que controlan el movimiento ocular) y pérdida de la audición.

[0010] En la actualidad, no existe un tratamiento específico reconocido para prevenir o invertir el deterioro clínico inexorable, y el manejo clínico de los síntomas es no específico y de apoyo. La supervivencia generalmente se relaciona con el grado de afectación gastrointestinal, con pacientes que a menudo mueren como resultado de caquexia, peritonitis, hemorragia esofágica, ruptura intestinal o neumonía por aspiración.

[0011] Con el fin de evaluar la mortalidad de MNGIE, se buscó en la literatura de lengua inglesa con la condición publicada entre octubre de 2005 a octubre de 2010 [PubMed utilizando los términos de búsqueda: MNGIE; Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial; Pseudoobstrucción intestinal crónica]. La edad de la muerte podría determinarse en diecinueve casos, para los cuales la media fue de 30,2 años, rango de 18 a 39 años (Aksoy et al., 2005; Said et al., 2005; Hirano et al., 2006; la Marca et al., 2006; Moran et al., 2006; Valentino et al., 2007; Giordano et al., 2008; Baris et al., 2010; Cardaioli et al., 2010). Esto se compara con Nishino et al. (2000) que calculó la edad media de la muerte como 37,6 años; con un rango de 26 a 58 años.

Tratamientos para MNGIE

[0012] La MNGIE es una enfermedad metabólica hereditaria rara para la cual actualmente no existen terapias aprobadas por la EMEA o la FDA. Existe un requisito crítico para desarrollar un tratamiento que pueda ser beneficioso.

[0013] No existen tratamientos específicos probados para MNGIE. El tratamiento actual es, por lo tanto, sintomático. El dolor abdominal y las náuseas/vómitos secundarios a la dismotilidad gastrointestinal son casi invariables. Estos síntomas se tratan sintomáticamente con analgésicos, fármacos estimulantes de la motilidad intestinal, antieméticos y antibióticos para el sobrecrecimiento bacteriano intestinal. En el dolor intratable, se ha informado que el bloqueo del nervio esplácnico o del plexo celíaco con bupivacaína es útil (Celebi et al, 2006; Shoffner, 2010). El dolor también puede ocurrir en las extremidades debido a polineuropatía periférica. Tal dolor neuropático generalmente se trata con agentes de acción central como amitriptilina o pregabalina. En individuos con MNGIE hay una mayor incidencia de perforación del intestino. Esto generalmente requiere cirugía abdominal de emergencia. La desnutrición es un problema importante en la mayoría de las personas con MNGIE. Se requieren con frecuencia varias formas de nutrición parenteral, incluida la nutrición parenteral total.

[0014] La hipertensión portal puede ocurrir y ser complicada por ascitis y varices esofágicas. Estas condiciones se tratan de la misma manera que cuando ocurren en otras condiciones. Los medicamentos que interfieren con la función mitocondrial deben evitarse en individuos con MNGIE. Los medicamentos metabolizados hepáticamente deben administrarse con cuidado o pueden estar contraindicados dependiendo de la función hepática. Por lo general, se requiere el aporte de fisioterapia y terapia ocupacional, particularmente para abordar los aspectos neurológicos de la afección. En los niños, pueden ser necesarios arreglos escolares especiales (Shoffner, 2010). MNGIE es una condición hereditaria y a las personas con esta afección se les debe ofrecer asesoramiento genético.

- 5 **[0015]** Timidina y desoxiuridina son libremente difusibles a través de las membranas celulares y existen en un estado de equilibrio entre los compartimentos celulares y plasma, y estrategias terapéuticas que tienen por objeto reducir o eliminar las concentraciones patológicas de timidina plasmática y desoxiuridina puede ser beneficiosa para pacientes con MNGIE. La hemodiálisis y la diálisis peritoneal ambulatoria continua se han utilizado en un intento de eliminar los metabolitos tóxicos (Spinazzola et al., 2002; la Marca et al., 2006; Yavuz et al., 2007); la hemodiálisis fue capaz de reducir los niveles de nucleósidos plasmáticos, pero hubo una rápida re-acumulación a niveles prediálisis entre las sesiones de diálisis (la Marca et al., 2006).
- 10 **[0016]** Aunque la diálisis peritoneal fue incapaz de demostrar una disminución de metabolitos en plasma, una mejora de los síntomas clínicos fue notada. Se ha demostrado que las infusiones de plaquetas, que contienen fosforilasa de timidina, reducen los niveles circulantes de timidina y desoxiuridina en dos pacientes (Lara et al., 2006). Sin embargo, la terapia plaquetaria a largo plazo no es una opción factible debido a la corta vida de las plaquetas transfundidas y los riesgos de desarrollar reacciones inmunes y transmisión de infecciones virales.
- 15 **[0017]** Más recientemente el trasplante alogénico de células madre ha demostrado una restauración parcial de la actividad de la fosforilasa de timidina de glóbulos blancos, y una reducción o desaparición de las concentraciones plasmáticas de timidina en pacientes que se injertaron con éxito (Hirano et al., 2006). La evidencia de que el beneficio clínico se puede lograr mediante la corrección de las anomalías bioquímicas se ha demostrado en un solo paciente; treinta meses después del injerto, se observó que los reflejos tendinosos que habían estado ausentes anteriormente habían regresado, y una mejoría en la conducción nerviosa. La nutrición parenteral total fue reemplazada por una dieta normal de 3.000 calorías diarias y las deposiciones se normalizaron (Hirano et al., 2008).
- 20 **[0018]** El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) ofrece la posibilidad de una corrección permanente de la deficiencia de fosforilasa de timidina. Hasta la fecha, nueve pacientes en todo el mundo han recibido 12 TCMH alogénicos; se realizó un segundo TCMH en tres pacientes (Halter *et al.*, 2010). Las fuentes de injerto empleadas fueron células madre de sangre periférica, médula ósea y sangre de cordón umbilical. Cuatro pacientes murieron, dos debido a la mortalidad relacionada con el trasplante y dos por su enfermedad. Los cinco pacientes restantes estaban vivos entre 8 y 48 meses después del trasplante y todos demostraron una reducción o desaparición de la timidina y la desoxiuridina plasmáticas. Se ha observado una mejora de los síntomas gastrointestinales y una leve mejoría de los síntomas neurológicos en dos pacientes.
- 25 **[0019]** TCMH alogénico es aún altamente experimental y conlleva un riesgo de mortalidad del 44%. El TCMH puede curar potencialmente, pero está limitado por la disponibilidad de un donante compatible. Los pacientes se encuentran en una condición clínica deficiente con una capacidad restringida para tolerar problemas relacionados con el trasplante. La administración de TCMH a estos pacientes presenta desafíos farmacológicos en términos de administración de fármacos con posible toxicidad mitocondrial, y el requerimiento de administración parental debido a la alteración de la función gastrointestinal y al deterioro de la absorción. Una propuesta de consenso publicada para estandarizar un abordaje del TCMH alogénico en MNGIE recomienda restringir el reclutamiento de pacientes con un donante óptimo a aquellos sin enfermedad irreversible en etapa terminal (Halter *et al.*, 2010). Por lo tanto, para muchos pacientes no existe una opción de tratamiento y el manejo clínico se basa en el alivio de los síntomas y la paliación.
- 30 **[0020]** Las dos últimas décadas ha visto la introducción de terapias de reemplazo de enzimas para el tratamiento con éxito de enfermedades metabólicas hereditarias, incluyendo la deficiencia de adenosina desaminasa, la enfermedad de Gaucher y otros trastornos de almacenamiento lisosomal. La administración de la enzima faltante, generalmente mediante inyección, permite la eliminación de los sustratos patológicos que se acumulan en estos trastornos metabólicos, traduciendo en beneficio clínico. Las modificaciones químicas de la enzima nativa se emplean a menudo en el proceso de fabricación para aumentar la estabilidad de la proteína, disminuir la inmunogenicidad y para permitir la dirección de la enzima al compartimento celular apropiado. El desarrollo de técnicas de ADN recombinante y células que sobreexpresan ha permitido producir cantidades de enzima pura a escala comercial.
- 35 **[0021]** La encapsulación de enzimas terapéuticas dentro de los eritrocitos autólogos es un enfoque terapéutico alternativo para la terapia de reemplazo de enzimas, y es aplicable a trastornos en los que el metabolito de plasma patológico es capaz de permear la membrana de los eritrocitos (Figura 1). La terapia de reemplazo enzimático encapsulado en eritrocitos tiene la ventaja de prolongar la semivida circulatoria de la enzima y mantener los niveles sanguíneos terapéuticos, reduciendo la dosificación y la frecuencia de las intervenciones terapéuticas, y anulando la necesidad de una costosa modificación química.
- 40 **[0022]** En julio de 2006, una dosis única de fosforilasa de timidina encapsulada por eritrocitos se administró a un paciente gravemente enfermo con MNGIE para los que no había ningún otro tratamiento. Al paciente se le administraron 1.020 unidades de fosforilasa de timidina encapsulada en $20,25 \times 10^{10}$ eritrocitos. A los 3 días después de la infusión, la excreción urinaria de timidina y desoxiuridina disminuyó a 6% y 13%, respectivamente, de las cantidades excretadas antes de la terapia. En paralelo, las concentraciones plasmáticas de estos metabolitos disminuyeron durante los primeros 3 días después de la infusión. Tristemente, el paciente murió de neumonía 21 días después. Se publican los resultados de este uso compasivo único de este enfoque terapéutico (Moran et al.,
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

2008).

[0023] Se han publicado otros estudios relativos a los eritrocitos y su administración. Bax et al. 2007 divulgan una evaluación de nueve años de la terapia con desaminasa de adenosina encapsulada por eritrocito portador (ADA) en un paciente con deficiencia de ADA de tipo adulto. El tratamiento demostró ser metabólico y clínicamente efectivo. Bax et al. 1999 informan sobre la supervivencia in vivo de los eritrocitos portadores humanos y la viabilidad de los eritrocitos portadores como un sistema sostenido de administración de fármacos. Bax et al. 2000 informan de estudios in vitro e in vivo con eritrocitos portadores humanos cargados con desaminasa de adenosina bovina nativa y conjugada con PEG.

Sumario de la invención

[0024] La presente invención proporciona mejoras significativas en el método utilizado en Moran et al, 2008.

[0025] La invención es como se define en las presentes reivindicaciones. En un aspecto, la invención proporciona eritrocitos autólogos de un paciente, los eritrocitos que contienen fosforilasa de timidina y que están libres de albúmina de suero bovino (BSA), en donde los eritrocitos autólogos se obtienen cargando los eritrocitos con una composición que comprende menos de 200 EU de endotoxina por mg de fosforilasa de timidina para uso en el tratamiento de MNGIE en un paciente.

[0026] También se describe un método de producción de la fosforilasa de timidina que está libre de proteínas de origen animal, que comprende la liberación de la fosforilasa de timidina a partir de células bacterianas al contactar las células con una enzima que daña la pared celular y que está libre de proteína animal, típicamente lisozima. El método puede comprender además la eliminación de la endotoxina de la fosforilasa de timidina tal como se extrae de las células tratando el extracto de fosforilasa de timidina con un detergente, formando una fase rica en detergente y una fase rica en agua donde la endotoxina se divide en la fase rica en detergente, y eliminar y descartar la fase rica en detergente. Los pasos (a), (b) y (c) se repiten opcionalmente dos o más veces.

[0027] La fosforilasa de timidina es típicamente una fosforilasa de timidina bacteriana, tal como una fosforilasa de timidina *E.coli*. La fosforilasa de timidina de *E. coli* puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma.

[0028] La presente invención también proporciona los regímenes de dosificación específicos para eritrocitos autólogos cargados con fosforilasa de timidina que pueden ser administrados a un paciente. La fosforilasa de timidina se administra típicamente al paciente a una dosis de 5 UI/kg a 1.000 UI/kg. El número de eritrocitos autólogos administrados al paciente puede ser de 10×10^{10} a 300×10^{10} , preferiblemente de 75×10^{10} a 150×10^{10} , y más preferiblemente de 100×10^{10} a 150×10^{10} .

[0029] Los eritrocitos autólogos se pueden administrar al paciente al menos una vez al mes, al menos una vez cada dos semanas o por lo menos una vez a la semana. La fosforilasa de timidina se administra preferiblemente a una dosis de 200 UI/kg una vez cada dos semanas.

[0030] La invención también proporciona una composición que comprende eritrocitos que contienen la fosforilasa de timidina y estar libre de albúmina de suero bovino (BSA), en la que los eritrocitos autólogos se pueden obtener mediante la carga de los eritrocitos con una composición que comprende menos de 200 UE de endotoxina por mg de fosforilasa de timidina. También se describe un método para preparar eritrocitos autólogos que contienen fosforilasa de timidina y están libres de proteínas animales distintas de proteínas derivadas del paciente del que se originan los eritrocitos autólogos, cuyo método comprende:

- (a) someter a diálisis hipoosmótica una suspensión de eritrocitos recogida del paciente en una solución que contiene fosforilasa de timidina libre de proteínas animales, en la que la diálisis hace que se formen poros en los eritrocitos y la fosforilasa de timidina para entrar en los eritrocitos;
- (b) resellar los eritrocitos exponiéndolos a una solución isoosmótica.

[0031] Se describen aspectos y realizaciones adicionales en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

[0032]

La Figura 1 muestra la sustitución enzimática encapsulada en eritrocitos. El metabolito plasmático elevado patológicamente cruza la membrana de eritrocitos en la célula donde la enzima encapsulada cataliza su metabolismo al producto normal. El producto es libre de difundir fuera de la célula en el plasma sanguíneo, donde se metabolizará más de lo normal.

La Figura 2 muestra reacciones catalizadas por fosforilasa de timidina.

La Figura 3 muestra la encapsulación de la enzima exógena usando la técnica de diálisis hipo/isoosmótica.

La Figura 4 muestra la encapsulación de fosforilasa de timidina por eritrocitos humanos en función de la actividad enzimática añadida al proceso de diálisis. Cada punto representa un experimento de diálisis. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de timidina en timina por minuto a 37°C.

La Figura 5 muestra el metabolismo de la timidina extracelular mediante eritrocitos cargados con fosforilasa de timidina en función del tiempo de incubación. Los eritrocitos cargados con enzimas se incubaron en: • plasma de un paciente con MNGIE y + solución salina tamponada con fosfato que contiene 15 $\mu\text{mol/l}$ de timidina.

La Figura 6 muestra las concentraciones de timidina y desoxiuridina en plasma durante las dosis crecientes de la enzima encapsulada en eritrocitos. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de timidina en timina por minuto a 37°C.

La Figura 7 muestra la excreción urinaria de timidina (o) y desoxiuridina (*) durante dosis crecientes de enzima encapsulada en eritrocitos.

La Figura 8 muestra la supervivencia *in vivo* de eritrocitos autólogos cargados con fosforilasa de timidina en un paciente con MNGIE, medido por marcado con 51Cr. MCL = vida media de la célula, $t_{1/2}$ = vida media.

La Figura 9 muestra las concentraciones de timidina y desoxiuridina en plasma durante la terapia de la invención.

La Figura 10 muestra las concentraciones de timidina y desoxiuridina en la orina durante la terapia de la invención.

La Figura 11 muestra la actividad de la creatina quinasa plasmática durante 22 ciclos de dosis crecientes de EE-TP.

La Figura 12 muestra un cromatograma de una columna de Q-Sepharose. Durante los lavados con tampón Tris, Triton X-100®, 45 mM NaCl y 2 M NaCl, se eluyen otras proteínas no relevantes de la columna y Triton X-114®. La fosforilasa de timidina relevante se eluye con 200 mM NaCl en un pico distinto, que se recogió por separado (fase II de la elución de 200 mM NaCl).

La Figura 13 muestra SDS-PAGE sobre 12,5% de Phast de muestras diluidas de fosforilasa de timidina purificada de la invención (lote piloto W1234) y un control (T6632) que contiene tanto fosforilasa de timidina como BSA. El lote piloto, que migró conjuntamente con la banda TP del control, es aproximadamente 5 veces más concentrado que el control (dilución diluida 1:100 frente a 1:20 del control). La banda de BSA falta en el lote piloto ya que no forma parte de la formulación final. 1: marcador de tamaño; 2,4: Control T6632, lote 118K8720 diluido 1:20; 3,5: W1234 lote 11101111 diluido 1:100. La Figura 14 muestra curvas de control positivas representativas de la respuesta del instrumento frente a la concentración de anticuerpo anti-TP en suero negativo de ratón (A) y suero negativo de perro (B). Estándares de calibración para anticuerpos anti-fosforilasa de timidina (ng/ml). Método de regresión = 5PL (estimación automática) factor de ponderación = $1/F^{**2}$. Respuesta = $(\text{min-max}) / ((1 + (\text{conc}/c)^{**\text{pendiente}})^{**M}) + \text{máx.}$ Min para (A) = 261,6800814. Máx. Para (A) = 1020084,70. Pendiente para (A) = 1,14791854. C para (A) = 13980,6138. M para (A) = 1,14834934. R-cuadrado para (A) = 0,9986. Min para (B) = 239,881720. Máx. Para (B) = 53269,6211. Pendiente para (B) = 1,20789355. C para (B) = 10119,0648. M para (B) = 17,0358819. R-cuadrado para (B) = 0,9991.

La Figura 15 muestra la respuesta del instrumento frente a la concentración de anticuerpos anti-TP construidos en diferentes diluciones de suero de ratón (parcela izquierda) y de perro (parcela derecha). Cada curva de calibración se analizó contra una curva estándar preparada en tampón (matriz 0%).

La Figura 16 muestra la actividad de fosforilasa de timidina encapsulada en (A) ratón y (B) eritrocitos de perro en función del tiempo de almacenamiento a 4 y 22°C. Los resultados se expresan como \pm SEM media de 4 experimentos.

La Figura 17 muestra los pesos corporales para perros machos y hembras a lo largo del período de aclimatación y durante cuatro semanas de tratamiento. Los resultados se expresan como media para cada grupo de 3 perros.

La Figura 18 muestra secciones de pulmón de (A) ratón de control que recibe eritrocitos con carga simulada que muestra histología normal, (B) ratón de control que recibe eritrocitos con carga simulada que muestra arterio pulmonar oclusivo del émbolo, (C) ratón tratado dos veces por semana con EE-TP que muestra émbolos y células inflamatorias perivasculares y (D) ratón tratado una vez cada dos semanas mostrando émbolos y células inflamatorias perivasculares. Ampliación original 10X para todas las micrografías, teñidas con hematoxilina y eosina.

La Figura 19 muestra secciones de timo de (A) perro de control que recibe eritrocitos con carga simulada que muestra histología normal, (B) perro tratado dos veces por semana con EE-TP que muestra atrofia moderada y (C) perro tratado dos veces por semana con EE-TP mostrando marcada atrofia. La ampliación original 4X para todas las micrografías, teñidas con hematoxilina y eosina.

Descripción de la lista de secuencias

[0033] La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de fosforilasa de timidina *E. coli*.

Descripción detallada de la invención

[0034] Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

Métodos

[0035] La invención proporciona eritrocitos autólogos para uso en el tratamiento MNGIE en un paciente. Los eritrocitos autólogos se obtienen del paciente, cargados con fosforilasa de timidina y pueden administrarse de nuevo al paciente. Los eritrocitos autólogos que deben administrarse al paciente no contienen ninguna proteína animal que no sea la derivada del paciente.

[0036] La terapia de reemplazo enzimático encapsulada en eritrocitos tiene la ventaja de prolongar la semivida circulatoria de la enzima y mantener los niveles sanguíneos terapéuticos, reduciendo así la dosificación y la frecuencia de las intervenciones terapéuticas, y anulando la necesidad de una costosa modificación química. Además, se minimizan las reacciones inmunogénicas que a menudo se observan en terapias de reemplazo de enzimas administradas por la ruta convencional. La terapia de reemplazo enzimático encapsulada en eritrocitos es particularmente útil en pacientes en quienes la mortalidad por trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (TCMH) sería demasiado alta, y también para aquellos en quienes no hay un donador compatible. También estaría indicado como terapia de rescate o mantenimiento para pacientes con MNGIE antes de la disponibilidad de un donante de TCMH adecuado.

[0037] También hay un número de ventajas del uso de eritrocitos autólogos que se recogen desde el paciente, cargado con la enzima y luego devueltos al paciente. Por ejemplo:

- No existe riesgo de contaminación con agentes infecciosos (p. ej., virus y priones) derivados de animales.
- El riesgo de sobrecarga de hierro se reduce ya que el paciente está recibiendo eritrocitos que se han recogido previamente de ellos. Esto significa que se pueden administrar dosis más altas de eritrocitos con la frecuencia necesaria para el tratamiento.
- Existe un bajo riesgo de contaminación bacteriana ya que los eritrocitos pueden ser recolectados del paciente, cargados con la enzima y devueltos al paciente en un corto espacio de tiempo. Los eritrocitos no autólogos serían almacenados por mayores períodos de tiempo y, por lo tanto, existe un mayor riesgo de contaminación bacteriana.
- La encapsulación es más eficiente y las células tienen una vida más larga una vez que se devuelvan al cuerpo.

[0038] La fosforilasa de timidina cargada en los eritrocitos está libre de proteínas animales, específicamente BSA. Los protocolos convencionales para purificar la fosforilasa de timidina implican el uso de BSA como estabilizador. El método para producir fosforilasa de timidina no implica el uso de BSA y también da como resultado bajos niveles de endotoxina que contaminan la enzima purificada.

Thymidine phosphorylase (TP)

[0039] El método implica eritrocitos de carga con la fosforilasa de timidina. La fosforilasa de timidina (EC 2.4.2.4), número CAS: 9030-23-3, es una enzima que cataliza la fosforilación reversible de los nucleósidos de pirimidina timidina y desoxiuridina en 2-desoxirribosa 1-fosfato y sus respectivas bases, timina y uracilo. (Figura 2). El nombre sistemático de esta clase de enzima es timidina:fosfato desoxi-alfa-D-ribosiltransferasa.

[0040] La enzima es parte de la ruta metabólica de recuperación de nucleósido de pirimidina y permite que las bases de pirimidina se reciclen para la biosíntesis de nucleótidos, mientras que la pentosa 1-fosfatos se convierten en compuestos intermedios de la derivación del fosfato de pentosa y glucólisis.

[0041] En los seres humanos, la fosforilasa de timidina es un homodímero de la subunidad de 55 kDa, que consiste de 482 aminoácidos (Nishino et al., 2001) y normalmente se expresa en las plaquetas, los ganglios linfáticos, bazo, vejiga, pulmón, hígado, placenta, linfocitos periféricos, cerebro y nervios periféricos, pero no se expresa en músculo esquelético, riñón, vesícula biliar, aorta o tejido adiposo (Usuki y col., 1990; Eccleston y col., 1995; Matsukawa et al., 1996). Las actividades enzimáticas en leucocitos de sujetos sanos son reportados a estar en el rango de 667 ± 205 nmol/h/mg (media de ± DE) (Spinazzola et al., 2002).

[0042] En los métodos descritos, los eritrocitos autólogos están cargados de la fosforilasa de timidina. La enzima puede ser cualquier fosforilasa de timidina adecuada. La enzima es típicamente una fosforilasa de timidina bacteriana. La fosforilasa de timidina bacteriana es preferiblemente una fosforilasa de timidina de *E. coli*. La fosforilasa de timidina *E. coli* es un homodímero de subunidad de 47 kDa que consiste en 440 aminoácidos. La fosforilasa de timidina *E. coli* comparte una identidad de secuencia del 40% con la secuencia humana (Barton et al., 1992).

[0043] La fosforilasa de timidina bacteriana es más preferiblemente una fosporilasa de timidina que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante del mismo. Una variante de SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos que varía de SEQ ID NO: 1 y que conserva la capacidad de fosforilar timidina (o realizar las reacciones que se muestran en la Figura 2). La capacidad de la enzima para fosforilar la timidina (o para llevar a cabo las reacciones que se muestran en la Figura 2) se puede analizar usando cualquier método conocido en la técnica.

5 [0044] En toda la longitud de la secuencia de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una variante será preferiblemente al menos 50% homóloga a la secuencia basada en la identidad de aminoácidos. Más preferiblemente, la variante puede ser al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% y más preferiblemente a al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntico a SEQ ID NO: 1.

10 [0045] Los métodos estándar en la técnica pueden ser usados para determinar la homología de secuencia. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede usar para calcular la homología, por ejemplo, se usa en sus configuraciones predeterminadas (Devereux et al. 1984). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular secuencias de homología o alineación (tales como identificar residuos equivalentes o secuencias correspondientes (típicamente en sus configuraciones predeterminadas)), por ejemplo como se describe en Altschul SF (1993) o Altschul et al. (1990).

15 El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

20 [0046] Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, por ejemplo de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o 30 sustituciones. Las sustituciones conservativas reemplazan a los aminoácidos con otros aminoácidos de estructura química similar, propiedades químicas similares o un volumen de cadena lateral similar. Los aminoácidos introducidos pueden tener una polaridad, hidrofiliidad, hidrofobicidad, basicidad, acidez, neutralidad o carga similares a los aminoácidos que reemplazan. Alternativamente, la sustitución conservativa puede introducir otro aminoácido que sea aromático o alifático en lugar de un aminoácido aromático o alifático preexistente. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son bien conocidas en la técnica.

25 [0047] Uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 pueden eliminarse adicionalmente de los polipéptidos descritos anteriormente. Se pueden eliminar hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o 30 residuos, o más.

30 [0048] Uno o más aminoácidos pueden alternativa o adicionalmente ser añadidos a los polipéptidos descritos anteriormente. Puede proporcionarse una extensión en el terminal amino o extremo carboxi de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o variante polipeptídica o fragmento de la misma. La extensión puede ser corta, por ejemplo de 1 a 10 aminoácidos de longitud. Alternativamente, la extensión puede ser más larga, por ejemplo hasta 50 o 100 aminoácidos.

35 [0049] La fosforilasa de timidina es típicamente una enzima recombinante que se clona y se produce en células que sobreexpresan. Por ejemplo, la enzima *E. coli* es típicamente una enzima recombinante que se clona y se produce en *E. coli* que sobreexpresa. Los métodos para la clonación y expresión de enzimas recombinantes son bien conocidos en la técnica.

40 *Purificación de fosforilasa de timidina*

[0050] Se divulga un método para producir fosforilasa de timidina que está libre de proteína animal, tal como BSA, y contiene una cantidad baja de endotoxina.

45 [0051] El método comprende la liberación de la fosforilasa de timidina a partir de células bacterianas al poner en contacto las células con una enzima que daña la pared celular y que está libre de proteína animal, opcionalmente lisozima. El método puede comprender además la eliminación de endotoxina de la fosforilasa de timidina tal como se extrae de las células mediante:

50 tratamiento del extracto de fosforilasa de timidina con un detergente, formando una fase rica en detergente y una fase rica en agua en donde la endotoxina se divide en la fase rica en detergente, y eliminando y descartando la fase rica en detergente; en donde las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo opcionalmente dos o más veces (por ejemplo, de 2 a 10 veces, de 2 a 5 veces, típicamente 3 o 4 veces).

55 [0052] El detergente es preferiblemente un detergente no iónico, más preferiblemente un detergente que comprende un óxido polietileno hidrófilo (PEG) y un grupo hidrocarburo hidrofóbico, más preferiblemente 1,1,3,3-tetrametilbutilo)fenilo-polietilenglicol (Triton X100®).

60 [0053] El método puede comprender además la purificación de la fosforilasa de timidina por cromatografía de intercambio iónico 15.

[0054] El método puede comprender aún más la digestión de ácidos nucleicos con ADNasa y ARNasa.

65 [0055] Como se discutió anteriormente, la enzima se produce típicamente en *E. coli*. La fosforilasa de timidina es típicamente purificada a partir de estas células mediante un método que comprende uno o más de los siguientes pasos:

- (i) Cosechar las células y resuspender las células en tampón y agitar para formar una pasta. Las células cosechadas pueden resuspenderse en cualquier tampón adecuado.
- (ii) Lisar las células. La lisis se puede lograr con lisozima.
- (iii) Digestión de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos típicamente se digieren con DNAsa o RNAsa.
- (iv) Centrifugar y filtrar el sobrenadante.
- (v) Eliminar las endotoxinas por tratamiento con detergente como Triton X114®. Esto generalmente implica ciclos repetidos de adición del Triton X-114®, mezcla en frío, incubación a 37°C para dividir la suspensión en una fase rica en detergente y una fase rica en agua, centrifugando y recolectando la fase rica en agua. La concentración de detergente añadida es preferiblemente menor que 5% (p/v), más preferiblemente aproximadamente 2% (p/v).
- (vi) Cromatografía de intercambio iónico para eliminar el detergente y eluir la enzima. Se puede usar cualquier método adecuado de cromatografía en columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de Q-Sepharose. Un protocolo típico implica cargar la fase que contiene la enzima en la columna, y lavar con tampones apropiados para eliminar el detergente y eluir la enzima de la columna. La proteína puede eluirse usando un tampón con alto contenido de sal.
- (vii) Concentrar y precipitar la fosforilasa de timidina eluida.
- (viii) Dialización.
- (ix) Tratamiento térmico seguido de centrifugación.
- (x) Preparación de la composición final. Típicamente, la fosforilasa de timidina se resuspende en un tampón que contiene uracilo y timerosal.
- (xi) Filtración final.
- (xii) La proteína purificada generalmente se almacena a 2-8°C.

[0056] Un protocolo detallado para la purificación de fosforilasa de timidina se describe en el Ejemplo 1.

[0057] Después de la purificación, la concentración de la fosforilasa de timidina en la composición final es típicamente no menos de 20 mg/ml (cuando se mide usando el método Biuret-TCA). Las concentraciones de proteína se pueden medir usando cualquier método adecuado.

[0058] La actividad de la proteína en la composición final es de al menos 900 unidades/ml, preferiblemente al menos 2.000 unidades/ml, más preferiblemente al menos 3.000 unidades/ml y más preferiblemente al menos 4.500 unidades/ml. Una unidad se refiere aquí a la cantidad de enzima que cataliza la conversión de sustrato de 1 µm en producto en 1 minuto a 25°C.

[0059] La concentración de endotoxina en la composición final es típicamente menor de 4.000 EU/ml, preferiblemente menos de 3.000 EU/ml, más preferiblemente menos de 2.000 EU/ml y lo más preferiblemente menos de 1.500 EU/ml. La concentración de endotoxina en la composición final puede ser inferior a 1.000 EU/ml o incluso inferior a 500 EU/ml. Una UE (Unidad de Endotoxinas) es equivalente a aproximadamente 0,1 a 0,2 ng de endotoxina. La concentración de endotoxina puede medirse usando cualquier ensayo adecuado, por ejemplo, el ensayo de lisado de amebocito limulus.

[0060] La relación de enzima a la endotoxina en la composición final (unidades de endotoxina/unidades de la fosforilasa de timidina) es típicamente menos de 5, preferiblemente menos de 2, más preferiblemente menos que 1 y lo más preferiblemente menos de 0,5.

[0061] La concentración de detergente (por ejemplo, Triton X-114®) en la composición final es típicamente menos de 0,01%, preferiblemente menos de 0,05% y más preferiblemente menos de 0,001%.

[0062] La composición final también contiene típicamente menos de 10 ppb, preferentemente menos de 1 ppb, más preferiblemente menos de 0,1 ppb y lo más preferiblemente menos de 0,01 ppb de ADN residual. Las concentraciones de ADN pueden medirse usando cualquier medio adecuado, por ejemplo, qPCR.

Eritrocitos autólogos cargados con fosforilasa de timidina

[0063] Los métodos implican la carga de eritrocitos autólogos con la fosforilasa de timidina bacteriana. En este enfoque, los eritrocitos se recogen del paciente, la enzima se carga en los eritrocitos y los eritrocitos cargados con la enzima se devuelven al paciente.

[0064] Típicamente, la sangre completa se recoge del paciente asépticamente, preferiblemente en tubos estériles que contienen heparina de bajo peso y dalteparina sódica molecular (tales como 9 unidades/ml de sangre).

[0065] Los eritrocitos pueden ser removidos del paciente y se cargan con la fosforilasa de timidina bacteriana por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Los eritrocitos pueden cargarse con la enzima por lisis isoosmótica inducida por campos eléctricos de alto voltaje o por hemólisis hipoosmótica, ya sea por dilución directa con una solución hipoosmótica o por diálisis en la que las células se dializan frente a una solución hipoosmótica (Ihler et al., 1973; Sprandel et al., 1979).

[0066] La enzima se carga preferiblemente en los eritrocitos usando la diálisis hipo-osmótica. Bajo condiciones hipo-osmóticas, los eritrocitos se hinchan debido a una afluencia de agua hasta que en un tamaño crítico, los poros se forman en la membrana. Aunque permeables, los fármacos y las enzimas terapéuticas pueden entrar en los eritrocitos por difusión. La permeabilidad se revierte mediante la restauración de las condiciones isoosmóticas, encapsulando el agente terapéutico dentro de los eritrocitos, que luego se devuelven al paciente (Figura 3).

[0067] Los eritrocitos preparados usando diálisis hipoosmótica retienen en mayor medida las características bioquímicas y fisiológicas del eritrocito intacto.

[0068] El procedimiento de diálisis hipo-osmótica es descrito por Bax et al. 1999. Brevemente, los eritrocitos se lavan con fosfatado de solución salina tamponada que contiene la enzima terapéutica. Las células se dializan contra un tampón hipoosmótico y los eritrocitos se vuelven a cerrar transfiriendo las bolsas de diálisis a solución salina tamponada con fosfato isoosmótica precalentada complementada con adenosina, glucosa y MgCh. Este proceso se describe con más detalle en el Ejemplo 1.

[0069] Se ha demostrado que la adición de glucosa, cloruro de magnesio y la adenosina al tampón de resellado, y el uso de bajas velocidades de centrifugación durante las etapas de lavado, permite que los eritrocitos para mantener la morfología celular normal y retienen proteínas citoplásmicas solubles y parámetros bioquímicos (Sprandel y col., 1981, Bax et al., 2000).

[0070] Las enzimas se cargan con una concentración apropiada de enzima terapéutica. La concentración de eritrocito de enzima es típicamente en el intervalo de 10 a 150 UI por 1×10^{10} células, preferiblemente en el intervalo de 20 a 75 UI por 1×10^{10} células y más preferiblemente en el intervalo de 25 a 50 UI por 1×10^{10} células. Una UI (Unidad Internacional) es aquí igual a la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de sustrato en producto por minuto a 37°C.

Administrar al paciente eritrocitos cargados con fosforilasa de timidina bacteriana

[0071] En los métodos descritos, los eritrocitos autólogos cargados con fosforilasa de timidina bacteriana son administrados de nuevo al paciente del que se eliminaron originalmente.

[0072] Después de la diálisis hipo-osmótica, eritrocitos cargados con la enzima entonces típicamente se resuspendieron en un volumen igual de plasma autólogo y se devuelven al paciente por infusión intravenosa lenta.

[0073] El número de eritrocitos autólogos administrado al paciente es típicamente de 50×10^{10} a 300×10^{10} , preferiblemente de 75×10^{10} a 200×10^{10} , y más preferiblemente de 100×10^{10} a 200×10^{10} .

[0074] La dosis de la fosforilasa de timidina bacteriana se administra al paciente por tratamiento es típicamente en el intervalo de 350 UI a 70.000 UI, más preferiblemente 1.000 UI a 20.000 UI y lo más preferiblemente 2.500 a 10.000 UI.

[0075] Los eritrocitos cargados con fosforilasa de timidina se administran típicamente al paciente a una dosis de la fosforilasa de timidina de 5 a 1000 UI/kg, de 30 a 300 UI/kg, de 50 a 200 UI/kg o de 75 a 150 UI/kg, preferiblemente a una dosis de 200 UI/kg.

[0076] El proceso de administración de eritrocitos autólogos cargados con fosforilasa de timidina bacteriana a un paciente se lleva a cabo con la frecuencia y tantas veces como sea necesario. Las dosis de la enzima y la frecuencia del tratamiento dependerán de la situación clínica del paciente. El tratamiento se puede llevar a cabo al menos una vez al mes, preferiblemente al menos una vez cada dos semanas y más preferiblemente al menos una vez a la semana. Incluso más preferiblemente, el tratamiento se lleva a cabo una vez cada dos semanas. Más preferiblemente, el tratamiento se lleva a cabo una vez cada dos semanas con una dosis de 200 UI/kg de fosforilasa de timidina. El tratamiento generalmente se lleva a cabo durante la vida del paciente. El tratamiento puede ser por un período de tiempo de al menos 3 meses, al menos 12 meses o al menos 24 meses.

[0077] Como resultado del tratamiento, la concentración de timidina o desoxiuridina en el plasma sanguíneo del paciente puede reducirse a 70% o menos del nivel de pre-tratamiento en un punto de de 3 a 12 meses, preferiblemente de 6 a 10 meses de tiempo, después del comienzo del tratamiento. La concentración de timidina o desoxiuridina se reduce preferiblemente a 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 5% o menos, 2% o menos o 0% del pre nivel de tratamiento La concentración generalmente se mide a mitad del ciclo o 5 días después de una dosis.

[0078] La concentración de timidina o desoxiuridina en la orina del paciente puede ser reducida a menos de 70%, menos de 50%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 2% o 0% de la concentración de pretratamiento en un punto de tiempo de 3 a 12 meses, preferiblemente de 6 a 10 meses, después del inicio del tratamiento. La concentración generalmente se mide a mitad del ciclo o 5 días después de una dosis.

Composición

[0079] La presente invención también se refiere a una composición que comprende eritrocitos que contienen la fosforilasa de timidina y estar libre de albúmina de suero bovino (BSA), en donde los eritrocitos autólogos son obtenibles mediante la carga de los eritrocitos con una composición que comprende menos de 200 EU de endotoxina por mg de fosforilasa de timidina. La cantidad de fosforilasa de timidina en los eritrocitos está típicamente en el rango de 350 UI a 10.000 UI.

Método de preparación de eritrocitos autólogos cargados con fosforilasa de timidina bacteriana

[0080] También se describe un método de preparación de eritrocitos cargados con una fosforilasa de timidina bacteriana. El método implica recolectar eritrocitos de un paciente y someter los eritrocitos a un procedimiento de diálisis hipoosmótica. El procedimiento de diálisis hipoosmótica se describe en detalle anteriormente.

[0081] Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1 - Procedimiento de encapsulación e incubación*Método*

[0082] 7 volúmenes de eritrocitos lavados y envasados se mezclaron con 3 volúmenes de fosfato frío de solución salina tamponada que contiene una concentración apropiada de enzima terapéutica. La suspensión se colocó luego en bolsas de diálisis con un límite de peso molecular de 12.000 daltons. Las células se dializaron frente a tampón hipo-osmótico (5 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L K_2HPO_4 , pH 7,4) a 4°C en un incubador refrigerado LabHeat especialmente modificado (BoroLabs, Berkshire, Reino Unido) con rotación a 6 rpm durante 120 minutos. El resellado de eritrocitos se logró transfiriendo las bolsas de diálisis a recipientes de solución salina tamponada con fosfato isoosmótico precalentado suplementado con 5 mmol/L de adenosina, 5 mmol/L de glucosa y 5 mmol/L de MgCh, pH 7,4, y la rotación 20 continuó a las 6 rpm durante 60 minutos en una incubadora LabHeat ajustada a 37°C. Los eritrocitos cargados con enzimas se lavaron tres veces en 3 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato suplementada con centrifugación a 100 xg durante 20 minutos.

Resultados de encapsulamiento

[0083] Se ha demostrado que fosforilasa de timidina catalíticamente activa recombinante a partir de *E. coli* se puede encapsular con éxito dentro de eritrocitos humanos. La Figura 4 muestra la encapsulación de la fosforilasa de timidina por los eritrocitos humanos en función de las unidades de enzimas añadidas al proceso de diálisis hipoosmótica. La actividad de la enzima encapsulada aumentó como una función de la actividad enzimática añadida a la diálisis, 30 hasta una concentración de aproximadamente 100 Unidades Internacionales (UI) por 1×10^{10} células; la eficiencia del atrapamiento disminuyó cuando se usaron concentraciones mayores a esta. El rango de actividad que se pudo encapsular usando esta concentración de enzima más alta fue de 24-38 UI por 1×10^{10} células.

Experimentos de incubación

[0084] Se ha demostrado que eritrocitos cargados con fosforilasa de timidina recombinante se incubaron a una hematocrito de 25% en solución salina tamponada con fosfato que contiene 15 $\mu\text{mol/L}$ de timidina, o plasma tomada de un paciente con MNGIE, son capaces de reducir las concentraciones de incubación extracelular de timidina. La Figura 5 muestra la concentración de timidina en el medio de incubación en función del tiempo de incubación. Después de 5 minutos de incubación, la enzima encapsulada había metabolizado aproximadamente el 87% de la timidina extracelular tanto en la solución salina tamponada con fosfato como en el plasma, y en 40 minutos toda la timidina se había metabolizado. La actividad de la fosforilasa de timidina fue indetectable en los medios extracelulares. Estos estudios *in vitro* demuestran que la timidina extracelular es capaz de atravesar la membrana eritrocítica y experimentar metabolismo mediante la fosforilasa de timidina encapsulada, y así proporcionar la justificación para estudios *in vivo* en pacientes con MNGIE.

Ejemplo 2 - Tratamiento de MNGIE

[0085] La paciente tenía 25 años de edad al inicio del estudio. Ella siempre había sido delgada y el diagnóstico de anorexia nerviosa se había considerado durante la adolescencia. A la edad de 23 años, una neuropatía periférica leve se desarrolló rápidamente seguida de síntomas de disfunción intestinal con anorexia, náuseas, dolor abdominal e hinchazón. Posteriormente se observó una oftalmoplejía externa. La neuropatía periférica y la dismotilidad intestinal habían sido implacablemente progresivas, de modo que el paciente requería el uso de una silla de ruedas, nutrición parenteral total y medicamentos regulares procinéticos y antieméticos.

[0086] La paciente es la segunda más joven de cuatro hermanos, un niño y 3 niñas, nacidos de padres que fueron primos hermanos. El hermano mayor murió a la edad de 17 años con una enfermedad no diagnosticada

caracterizada por dismotilidad intestinal desde la edad de 2 años, inicialmente vómitos y en menor grado diarrea. A partir de los 12 años hubo episodios recurrentes de pseudoobstrucción intestinal con anorexia y cahexia en curso. En los pocos meses anteriores a la muerte se desarrolló una polineuropatía periférica. La hermana menor desarrolló una neuropatía periférica a la edad de 18 años que en 10 meses estuvo acompañada por una disfunción intestinal con anorexia, vómitos y cahexia. Hubo un rápido deterioro, y la muerte fue de 22 meses después del primer inicio de los síntomas.

[0087] Hasta la fecha, la paciente ha recibido 31 ciclos de tratamiento durante un período de 24 meses. Inicialmente, la paciente recibió infusiones intravenosas de eritrocitos cargados con fosforilasa de timidina una vez cada cuatro semanas, comenzando con una dosis de 6 UI/kg (dosis total de 200 UI). La fosforilasa de timidina fue la de SEQ ID NO: 1. La dosis se ha aumentado gradualmente a 20 UI/kg una vez cada dos semanas, administrada como una infusión de 30 minutos en un entorno hospitalario. Se prevé que la dosis se podría aumentar a 150 UI/kg.

[0088] La administración inicial de enzima encapsulada de eritrocitos redujo las concentraciones plasmáticas pre-terapia de timidina y desoxiuridina de 9,8 $\mu\text{mol/L}$ y 20,0 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, a concentraciones de ciclo medio de 2,4 a 5,2 $\mu\text{mol/L}$ de timidina, y 6,2 - 10,6 $\mu\text{mol/L}$ para desoxiuridina, para el día 250 (Figura 6). En el día 240, la nutrición parenteral total se inició por motivos clínicos con el objetivo de proporcionar un requerimiento total de calorías por esta vía. Durante los siguientes 250 días, las concentraciones intraciclo se mantuvieron a niveles similarmente reducidos, pero las concentraciones del ciclo final fueron más altas que antes, pero aún más bajas que los niveles previos al tratamiento. Desde el día 550, los niveles de ciclo de finalización fueron iguales o superiores a los niveles de pretratamiento; esto coincidió con el desarrollo de lipaemia y lipiduria a partir de la nutrición parenteral total. Cuando fueron posibles las muestras de sangre intra-ciclo, éstas revelaron reducciones significativas en las concentraciones de metabolitos plasmáticos a partir de los valores del ciclo final. El efecto de la enzima encapsulada en eritrocitos en los metabolitos plasmáticos se confunde por lo tanto con la administración de nutrición parenteral total, cuyo componente lipídico se sabe que es hepatotóxico y metabolizado por la mitocondria, el sitio de la patología primaria en esta afección. Se sabe que los lípidos se adsorben en la superficie de la membrana de glóbulos rojos y no está claro este efecto sobre la terapia encapsulada en eritrocitos.

[0089] La excreción de metabolitos urinarios disminuyó de valores pre-tratamiento de 85 $\mu\text{mol/24 horas}$ y 137 $\mu\text{mol/24 horas}$ respectivamente, para timidina y desoxiuridina, a niveles de 0 - 58 $\mu\text{mol/24 horas}$ para la timidina, y 0,3 - 63 $\mu\text{mol/24 horas}$ para la desoxiuridina desde el día 210 en adelante (Figura 7).

[0090] El beneficio clínico actualmente está siendo evaluado longitudinalmente por la realización de evaluaciones neurológicas, el hígado y pruebas de función renal, las escalas de puntuación de calidad de vida, y las escalas de puntuación clínica y de la enfermedad.

[0091] Un estudio de etiquetaje de cromo de eritrocitos [^{51}Cr] de los eritrocitos cargados de fosforilasa de timidina preparados a partir de este paciente demostró una vida normal de circulación media de células, y la vida media de 108 y 32 días, respectivamente (Figura 8) que demuestra la viabilidad del eritrocito como vehículo para mantener niveles terapéuticos de enzima en sangre. No se han detectado anticuerpos contra la fosforilasa de timidina, medida por nuestro ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La paciente toleró la terapia y, tres meses después de iniciar la terapia, la paciente informó de una reducción en el número de ataques de náuseas y vómitos y ganó 4 kg de peso.

[0092] Los resultados para otro paciente se muestran en las Figuras 9, 10 y 11. Este paciente era un hombre que se presentó a los 26 años de edad con polineuropatía sensitivomotora periférica, oftalmoplejía externa pero mínima dismotilidad intestinal. La terapia EE-TP se inició 3 meses después del diagnóstico. El EE-TP se preparó usando el procedimiento de diálisis hipoosmótica. Los ciclos de tratamiento fueron aproximadamente una vez por mes. El paciente ha recibido 22 ciclos de dosis crecientes de EE-TP (17 a 44 UI/kg).

[0093] Se observaron y mantuvieron las reducciones en los nucleósidos plasmáticos intracelulares, la excreción de nucleósidos urinarios y la actividad de quinasa de creatina (Figuras 9, 10 y 11). Una unidad de actividad TP se define como la cantidad de enzima requerida para convertir 1 μmol de timidina a timina por minuto a 37°C.

[0094] Después de 18 meses de terapia, el paciente mostró una mejora en la marcha y el equilibrio y la mejora de la ataxia sensorial y la función de dedo fino.

[0095] Las puntuaciones de calificación de la enfermedad se muestran en la Tabla 1. Estos resultados reflejan principalmente mejoras en la caída del pie y la tolerancia al ejercicio.

Tabla 1: puntajes de las escalas de calificación de enfermedades

	Escala	Pre-terapia	1 año	1,5 años
5	SF36: Componente físico (media de la población 50±10) Componente mental (media de la población 50±10)	51 52	52 51	55 52
10	Escala mitocondrial de Newcastle (normal = 0): I (funcionamiento neurológico general) II (funcionamiento específico del sistema) III (evaluación clínica)	4 2 11	3 2 11	3 2 11
15	Puntajes neurológicos MRC: Motor (normal = 100) Sensorial (normal = 0, puntaje máximo = 64)	62 21	68 21	74 18
	Escala global de limitación de neuropatía (0 = sin discapacidad, 12 = incapacidad máxima)	3	3	3

Ejemplo 3 - Purificación de fosforilasa de timidina

20 **[0096]** La quinasa de timidina se purificó a partir de un sedimento celular de *E. coli*. Los *E. coli* se transfectaron para sobreexpresar quinasa de timidina de SEQ ID NO: 1, se cultivaron y se cosecharon usando técnicas estándar.

25 **[0097]** El sedimento de células (300 g de células) se resuspendió en 750 ml 10 mM Tris, 1,5 mM de tampón EDTA pH 7,5 con agitación durante 30 minutos. Las células se lisaron usando 4,5 millones de unidades de lisozima de origen libre de animales. Los ácidos nucleicos se digirieron añadiendo 3.000 unidades de ADNasa y 600 unidades de ARNasa (también de origen exento de animales) con agitación durante 60 minutos.

30 **[0098]** La suspensión se centrifugó a 15.000 g durante 1 hora. El sobrenadante se filtró a través de filtros de 5 µm y 0,8 µm. El pH se ajustó a 8,0.

35 **[0099]** La endotoxina se eliminó mediante tratamiento con Triton X-114®. Se añadió Triton X-114® al 20% (p/v) al sobrenadante a 1/10 del volumen, seguido de mezclado en frío durante 30 minutos, incubación a 37°C durante 1 hora y centrifugación durante 40 minutos. a 20.000 g a 25°C. La fase superior se recogió y el ciclo se repitió tres veces más. La fase superior final se añadió después a una columna de Q-sefarosa a 5 ml/min. La columna se lavó con 7 volúmenes de columna de Tris 20 mM, pH 8; 7 volúmenes de columna de Tris 10 mM, Triton X-100® al 0,1% (p/v) pH 8; 7 volúmenes de columna de 20 mM Tris pH 8; y 8 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 45 mM, pH 8. La fosforilasa de timidina se eluyó a continuación con 7 volúmenes de columna de Tris 20 mM, 200 mM NaCl, pH 8, y finalmente la columna se lavó con 2 M NaCl. El cromatograma de la columna Q-sefarosa se muestra en la Figura 12.

40 **[0100]** La concentración de la fosforilasa de timidina se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm, y la proteína se concentró hasta un OD₂₈₀ 19-25 usando la concentración de giro (10 kD de corte de peso molecular). Se añadió sulfato de amonio al 65% de saturación y se mezcló durante la noche.

45 **[0101]** La solución que contiene la proteína se centrifugó a 22.000 g durante 40 minutos y el sedimento se resuspendió en el volumen mínimo de fosfato de potasio 10 mM, 2,9 mM uracilo pH 6,8. La solución se dializó contra 2 x 2L de fosfato de potasio 10 mM, uracilo 2,9 mM, pH 6,8.

50 **[0102]** El dializado se incubó en vidrio Erlenmeyer en un baño de agua a 40°C durante 30 minutos después se enfrió a 10°C antes de la centrifugación a 22.000 g durante 60 minutos. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 0,25 volúmenes de fosfato de potasio 2,5 M, uracilo 10 mM, timerosal al 0,1% (p/v) y se mezcló bien. La composición se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y el producto final se almacenó a 2-8°C. Los niveles de endotoxina se midieron mediante el ensayo lisado de amebocito limulus, y las concentraciones de Triton X-114® se determinaron mediante HPLC. La concentración final de fosforilasa de timidina se determinó mediante el ensayo Biuret-TCA, se verificó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE (resultados que se muestran en la Figura 13) y la secuenciación N-terminal. La actividad de la proteína purificada se determina mediante el ensayo de actividad de fosforilasa de timidina. La concentración residual de ADN se verificó mediante qPCR.

60 **[0103]** La producción de un potente TP con un bajo nivel de endotoxina se ha logrado. Pudimos reducir el nivel de endotoxinas, usando Triton X-114, desde un nivel original de millones de EU/ml hasta 1,655 EU/ml sin reducir la actividad de TP y sin rastros de Triton X-114. Redujimos la relación EU/TP en un orden de magnitud, de 5,3 a 0,35 en el producto final.

65

Tabla 2: Resultados analíticos

Prueba	Ensayo	Resultados	Especificaciones propuestas
Apariencia	Inspección visual	Líquido ligeramente nebuloso, amarillo claro	Ligeramente nebuloso, líquido amarillo claro
Proteína	Biuret-TCA	31,3 mg/ml	> 20 mg/ml
Actividad	Ensayo de actividad TP	4.686 U/ml	Al menos 900 unidades/ml
Tamaño	SDS-PAGE	Similar a la banda TP de control	Similar a la banda TP de control
Endotoxina	Amebocito de Limulus	1.655 EU/ml	<4000 EU/ml
Triton X-114	HPLC	<0,001%	NMT 0,01%
Pureza	Secuencia N-terminal	Coincide con la secuencia de aminoácidos TP N-terminal (explosión NCBI)	Coincide con la secuencia de aminoácidos TP Nterminal (explosión NCBI) de MFLAQEIIIRK
ADN residual	qPCR	0,01 ppb	<10 ppb
Bioburden		3 UFC/ml	<10 CFU/ml
Kanamicina	LC-MS-MS	0,23ppm	<10 ppm

Tabla 3: Volumen, actividad TP y rango de endotoxinas después de cada paso de purificación

	Volumen (mL)	Actividad TP (U/mL)	Actividad TP total	Rendimiento de la actividad de TP	Endotoxina EU/ml
Después de lisis y filtración	620	1.737	1.076.940	100%	> 3.000.000
Después de 4 ciclos de tratamiento con Triton	260	1.656	430.560	40%	3.000-30.000
Proteína eluida de la columna	410	618	253.380	23%	30-300
Después de la formulación final	43	4.686	206.184	19%	1.655

Ejemplo 4 - Desarrollo de un inmunoensayo para la medición de anticuerpos anti-fosforilasa de timidina en suero de ratón y perro

1. Materiales y métodos

[0104] Los ensayos se validaron de acuerdo con las directrices de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y el estudio se realizó de acuerdo con los estándares de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) (FDA 2001; FDA 2009; EMEA 2006; Miller et al. al., 2001; Mire-Sluis et al., 2004; Shankar et al., 2008; El Reglamento de buenas prácticas de laboratorio; Principios de buenas prácticas de laboratorio de la OCDE, Directiva de la Comisión de las CE 2004/10/EC).

1.1 Reactivos

[0105] Fosforilasa de timidina recombinante *E. coli* (TP, 26,6 mg/ml), el candidato de enzima terapéutica producido para estudios pre-clínicos GLP, se empleó en el desarrollo y la validación de este inmunoensayo (Sigma-Aldrich, Israel). El anticuerpo anti-TP de conejo purificado por afinidad (0,518 mg/ml) se produjo de forma personalizada (Open Biosystems, EE.UU.). El tampón de lavado fue solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma Aldrich, Reino Unido) con 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Reino Unido). La solución Bloqueador A consistió en 5% (p/v) del Bloqueador A en el tampón de fosfato MSD (Meso Scale Discovery, EE.UU.). El tampón de ensayo (PBS, Tween 20 al 0,05% (v/v), Bloqueador A al 1% (p/v) consistía en 1 volumen de solución de Blocker A al 5% y 4 volúmenes de tampón de lavado. El tampón de lectura T (4x) fue suministrado por Meso Scale Discovery, EE.UU. Y se diluyó 1 en 2 con agua de pureza ultra alta.

1.2 Preparación de conjugados biotinilados y sulfo-TAG TP

[0106] El formato de inmunoensayo puente requiere TP para ser conjugado con biotina y conjugado con sulfo-TAG; TP biotinilado sirvió como el antígeno de captura y el TP conjugado sulfo-TAG como el antígeno de detección. TP se conjugó con biotina usando el kit EZ-Link sulfo-NHS biotina (Pierce Biotechnology, EE.UU.). El TP se desaló primero usando una columna de centrifugación de ceba desalina (Pierce Biotechnology, EE.UU.) equilibrada con PBS, con centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos, y luego se diluyó con PBS para formar una solución madre secundaria de 10 mg/ml. Se añadió un volumen calculado de sulfo-NHS biotina EZ-Link directamente a 500 µL de solución madre secundaria TP y se incubó durante 30 minutos, con mezcla a temperatura ambiente. El TP conjugado con biotina se desaló usando una columna Zebra desalt spin equilibrada con PBS, con centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos y se almacenó a 4°C hasta su uso.

[0107] La conjugación de TP con sulfo-TAG se realizó usando éster NHS de sulfo-TAG (Meso Scale Discovery, EE.UU.). Primero se desaló TP como se describió anteriormente y se diluyó con PBS para formar una solución madre secundaria de 10 mg/ml. Se añadió un volumen calculado de éster de sulfo-TAG a 350 µL de solución madre de TP secundaria y se incubó con mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. El conjugado sulfo-TAG TP se desala como se describe anteriormente y se almacena a 4°C hasta su uso.

1.3 Piscinas de sueros de control negativo

[0108] Muestras de suero de perro individual (n = 11) y de ratón (n = 15) se rastrearon mediante análisis (n = 1 por duplicado) contra curvas de calibración de control positivas para la presencia de anticuerpos anti-TP. Los sueros en blanco de perros y ratones individuales se combinaron para producir grupos de sueros de perros y ratones de control negativo, respectivamente. Estos se almacenaron a -20°C hasta que se requirieron para definir el punto de corte y preparar muestras de control de calidad (QC) y curvas de calibración.

1.4 Estándares de control positivo

[0109] Reservas estándar de control positivo primario de anticuerpos anti-TP (0,518 mg/ml) se diluyeron con sueros de control negativo (de perro o ratón según sea apropiado) para formar reservas estándar secundarias de control positivo de 100 µg/ml, y esto fue más diluido con sueros de control negativo (de perro o ratón según corresponda) para formar una reserva estándar de control positivo terciario de (25.000 ng/mL). La reserva estándar terciaria se diluyó con sueros de control negativo (perro o ratón, según corresponda) para producir estándares de trabajo en el intervalo de 2,50 ng/ml a 7.500 ng/mL. Antes del análisis, los estándares de control positivo se diluyeron 1 en 10 con tampón de ensayo.

1.5 Validación de muestras de control de calidad

[0110] Sueros de control negativo de perro y de ratón se enriquecieron con anticuerpos anti-TP para proporcionar tres concentraciones en relación con el punto de corte: bajo (justo por encima de punto de corte), media (rango dinámico de medio ensayo) y alta (rango dinámico de alto ensayo). Los sueros de control negativo se usaron como patrones de QC de control negativo. Todas las muestras de QC se prepararon en alícuotas de 20 µL y se almacenaron a -70°C. Antes del ensayo, las muestras de QC se diluyeron 1 en 10 usando 10 µL de muestra QC y 90 µL de tampón de ensayo.

1.6 Procedimiento de inmunoensayo

[0111] Los ensayos se realizaron usando un inmunoensayo electroquimioluminiscente de puente (ECL). Brevemente, se añadieron 25 µL, patrón de control positivo, blanco, control negativo, muestras de QC y muestras de prueba (con o sin fosforilasa de timidina según corresponda) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de polipropileno (Fisher Scientific, UK) seguido de 50 µL de conjugado Mastermix (0,0625 µg/ml, biotina TP/0,0313 µg/ml sulfo-TAG TP, usando tampón de ensayo como diluyente). Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas de microtitulación establecido a 600 rpm (Micromix, DPC Ltd, Gales). Tras el comienzo de esta incubación, se añadieron 150 µL de solución bloqueador A a cada pocillo de una placa de estreptavidina estándar de 96 pocillos multi-matriz (Meso Scale Discovery, EE.UU.), que luego se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación a 600 rpm. La placa de múltiples matrices se lavó tres veces con 200 µL de tampón de lavado por pocillo usando un lavador de placas de microtitulación (Wellwash, Thermo Life Sciences Ltd, Reino Unido). El último lavado se aspiró y la placa se secó mediante inversión sobre papel absorbente. Cincuenta microlitros de cada pocillo de la placa de 96 pocillos de polipropileno se transfirieron a los correspondientes pozos duplicados en la placa de estreptavidina estándar de 96 pocillos multi-matriz. La placa de múltiples matrices se cubrió luego, se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, con agitación a 600 rpm, y esto fue seguido por tres lavados con 200 µL de tampón de lavado por pocillo usando la arandela de placas. El último lavado se aspiró y la placa se secó mediante inversión sobre papel absorbente. Finalmente, se añadieron 150 µL de tampón de lectura T (2x) a cada pocillo y la placa se leyó en un MSD Sector Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, EE.UU.).

1.7 Parámetros de validación del método bioanalítico

1.7.1 Optimización de reactivos

5 [0112] Se llevaron a cabo ensayos de tablero de damas y durante el curso tiempo para optimizar las concentraciones de reactivo y condiciones de incubación. Esto incluyó la optimización de las concentraciones de TP biotinilado (rango 0,0313 a 2,00 µg/ml), sulfo-TAG TP (rango 0,0313 a 2,001 µg/mL) y anticuerpo de control positivo (rango 0 a 20.000 ng/mL, véase abajo).

1.7.2 Curva estándar de calibración

10 [0113] Se evaluaron dieciséis concentraciones de anticuerpos anti-TP diluidos en tampón de ensayo en el intervalo de 0 a 20.000 ng/ml (n = 2, por duplicado) para determinar un intervalo de curva de calibración.

1.7.3. Idoneidad de los estándares de control positivo

15 [0114] Utilizando el intervalo de calibración óptimo determinado anteriormente, se prepararon estándares de calibración por duplicado de anticuerpos anti-TP en sueros de control negativo agrupados y se diluyeron con tampón a la dilución requerida mínima determinada (MRD, véase a continuación). Se analizaron veintiséis curvas de calibración de control positivo para cada especie durante la validación. La exactitud acumulada (error relativo,% RE) y la precisión (coeficiente de variación,% CV) de las concentraciones calculadas de nuevo de todos los lotes de validación calculados se utilizaron para acceder a la idoneidad del modelo de regresión para cada especie. La misma rutina de ajuste se aplicó a todos los lotes de ensayo realizados posteriormente a lo largo del estudio de validación.

1.7.4. MRD

25 [0115] Las curvas estándar preparadas en suero entero de perro y ratón se diluyeron con tampón de ensayo para dar las siguientes diluciones de sueros: 1 en 100 (1%), 1 en 20 (5%), 1 en 10 (10%), 1 en 2 (50%) y puro (suero entero, 100%). Cada curva de calibración se analizó contra una curva estándar preparada en tampón (matriz 0%). El MRD se identificó como la dilución a la que la señal de las muestras individuales no es significativamente diferente de la señal del tampón. El MRD fue confirmado durante el experimento de selectividad, véase abajo.

1.7.5. Selectividad

35 [0116] La selectividad se evaluó para demostrar que el anticuerpo diana se mide y que la cuantificación no se ve afectada por la presencia de la matriz biológica, los metabolitos o los fármacos administrados conjuntamente. Para cada especie, 10 muestras de suero individuales y el suero de control negativo se enriquecieron con anticuerpos anti-TP a concentraciones bajas (70 ng/mL) y altas (7000 ng/mL). Se prepararon dos alícuotas de cada muestra enriquecida y la muestra no enriquecida coincidente. Se incubaron muestras enriquecidas y emparejadas sin pintar durante una hora, una alícuota con tampón y una alícuota con TP libre (0,125 µg/ml, teniendo en cuenta la MRD establecida). Se realizaron dos ensayos de análisis, cada uno de los cuales consistió en 5 muestras y el suero de control negativo, que se añadieron o no y se preincubaron con y sin TP, más una curva de calibración.

40 [0117] El porcentaje de inhibición de la señal en presencia de TP libre proporciona una indicación preliminar del punto de corte de ensayo confirmatorio basado en la variabilidad de la inhibición de concentraciones de anticuerpos cero, bajas y altas. Esto se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición de señal (\%)} = 100 \times [1 - (\text{muestra inhibida por droga/muestra no inhibida})]$$

1.7.6 Punto de corte del ensayo y sensibilidad

50 [0118] El punto de corte de un ensayo es el nivel de respuesta del ensayo a o por encima de, cual la muestra se define para ser positiva y por debajo del cual se define para ser negativa. Para cada especie, se analizaron 15 muestras de suero en blanco individuales junto con suero de control negativo que o bien no se había purificado o se había enriquecido con concentraciones de anticuerpo anti-TP bajas (106 ng/ml), medias (1.000 ng/ml) y altas (7.000 ng/ml) y se preincubaron en ausencia y presencia de TP libre (0,125 ug/ml), en tres ocasiones distintas (n = 1 en duplicado) y se realizaron por dos analistas.

60 [0119] Los datos de punto de corte del ensayo se evaluaron para determinar si un punto de corte flotante o un punto de corte fijo era apropiado para la metodología de ensayo utilizada. El punto de corte de cribado se calculó utilizando el enfoque descrito por Shankar *et al.* (2008) Para cada especie, se evaluó la normalidad de los datos de 15 muestras con la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Si los datos no se distribuyeron normalmente, se aplicaron transformaciones de registro o raíz cuadrada. Se realizó una evaluación de los valores atípicos al considerar los residuales eliminados estudiados; se excluyeron los residuos superiores a ± 3 desviaciones estándar (DE). Una vez que se eliminaron los valores atípicos, se volvió a evaluar la normalidad de los datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk; dependiendo del resultado, el punto de corte de validación (YCP) se definió como el 95% de Quantile para los datos no distribuidos normalmente, o + 1,645* DE media para los datos de distribución normal. El

factor de corrección (CF) se definió como VCP menos el medio de control negativo, o VCP menos el medio de control negativo, dependiendo de si se asumió normalidad o no. El punto de corte de detección (SCP) se definió como el VCP o el control negativo + CF, dependiendo de si los promedios y las varianzas entre las ejecuciones fueron similares.

5

1.7.7. Precisión, precisión y deriva de ensayo

[0120] La precisión intraensayo (variabilidad entre repeticiones de la misma muestra en un ensayo) y las concentraciones iniciales de QC se determinaron a partir del análisis replicado de muestras de QC de validación en tres concentraciones relativas al punto de corte bajo (justo arriba), (rango dinámico del ensayo medio) y alto (rango dinámico del ensayo alto). Las muestras de suero de control negativo se usaron como muestras de QC de control negativo. Todos fueron analizados de una vez ($n = 3$ en duplicado) al mismo tiempo que los estándares de control positivo.

[0121] La precisión del ensayo (variabilidad a través de múltiples días) y la deriva de placa de ensayo se determinó mediante el análisis de muestras de QC de validación baja, media y alta ensayadas en tres días separados para el perro y cuatro días separados para el ratón ($n = 1$ en duplicado) con un conjunto de muestras de QC analizado directamente después de los estándares de control positivo y un conjunto adicional de muestras de QC en las últimas columnas de la placa de ensayo. Se añadió tampón a los pocillos que no contenían estándares de control positivo o muestra de QC de validación.

[0122] Los criterios de aceptación de las muestras de QC se basaron en lo siguiente: las muestras de QC bajo deben estar por encima del punto de corte, la muestra de QC medio debe estar en el medio del rango dinámico (por encima del nivel de QC bajo pero por debajo del alto nivel de QC) y la muestra de alto control de calidad debe estar en el extremo superior del rango dinámico.

[0123] La precisión intraensayo se consideró aceptable cuando la lectura de la respuesta media del instrumento (IR) y la concentración en cada nivel de QC se observaron dentro del 6-20%. La precisión entre lotes de la respuesta media del instrumento y la concentración en cada nivel debe estar dentro de 6-20%, de la línea de base como se determina a partir del análisis de QC dentro del ensayo. Se consideró que la deriva del ensayo era insignificante si la lectura de IR y/o las concentraciones de las muestras de QC de validación (si correspondía) al comienzo y al final de la placa de ensayo estaban dentro del 6-20%, calculadas de la siguiente manera:

Diferencia porcentual = $100 \times \frac{QC\ IR\ delantero - QC\ IRJ\ medio\ trasero}{QC\ IR\ delantero + QC\ IR\ trasero}$

35

1.7.8 Estabilidad

[0125] La estabilidad de los anticuerpos anti-TP en ratón y sueros de perro a temperatura ambiente y después de tres ciclos de congelación-descongelación se evaluó mediante el análisis de muestras de control de calidad a concentraciones bajas, medias y altas contra normas de control positivo recién preparadas. Para la estabilidad a corto plazo de la temperatura ambiente, se descongelaron partes alícuotas de cada QC a temperatura ambiente durante dos horas (las muestras de la prueba de duración máxima esperadas se descongelarán antes del análisis) antes del análisis ($n = 3$ en duplicado). Para la estabilidad a corto plazo de la temperatura ambiente de las muestras diluidas, se descongelaron alícuotas de cada QC a temperatura ambiente, se diluyeron con tampón a la MRD y se almacenaron a temperatura ambiente durante 1 hora (las muestras de prueba esperadas se preincubaron con TP) análisis ($n = 3$ en duplicado) en un ensayo.

[0126] Para la evaluación del efecto de ciclos de congelación-descongelación repetidos sobre la estabilidad de los anticuerpos anti-TP en la matriz biológica, tres alícuotas de cada concentración de QC (almacenadas a $-70^{\circ}C$) fueron descongeladas, sin ayuda durante 2 horas a temperatura ambiente. Las alícuotas se volvieron a congelar durante al menos 12 horas. El segundo día, las muestras se eliminaron junto con un conjunto adicional de muestras de QC congeladas (3 partes alícuotas en cada concentración de QC) y se repitió el proceso de congelación y descongelación. El tercer día, ambos conjuntos de muestras de QC se eliminaron junto con un conjunto adicional de muestras de QC congeladas y luego se descongelaron. Los tres conjuntos de muestras de control de calidad se analizaron luego para determinar la estabilidad después de uno, dos y tres ciclos ($n = 3$ por duplicado) en un ensayo.

[0127] La estabilidad se verificó ppor si el análisis de estabilidad cumple los criterios de la precisión media (% CV) y la media RE (%) estaba dentro de $\pm 20\%$ de las concentraciones de línea de base.

1.7.9 Robustez

[0128] La robustez del ensayo se evaluó mediante la evaluación de pequeñas y deliberadas perturbaciones de las condiciones de ensayo; las concentraciones de muestras de QC de validación en concentraciones bajas, medias y altas se analizaron con tiempos de incubación prolongada en una ejecución ($n = 1$ en duplicado) concurrentemente con estándares de control positivo; el tiempo de ensayo se extendió a 15 minutos adicionales por hora en cada etapa de incubación. El ensayo se considera robusto cuando se observaron los criterios de precisión final dentro del

65

6-20% para los tiempos de incubación probados.

1.7.10. Prozona

5 **[0129]** Se investigó la prozona de ensayo (efectos de gancho) causada por altos niveles de anticuerpos anti-TP mediante dilución en serie de una muestra con altas concentraciones (que contiene anticuerpos anti-TP a una concentración 3,5 veces mayor que el estándar superior) con suero de control negativo. Los efectos de Prozona se consideraron como no presentes siempre que los valores de la muestra permanecieran por encima del estándar de control positivo superior.

10

Manejo de datos y estadísticas

15 **[0130]** Toda la adquisición y evaluación de datos se realizó utilizando el paquete de software Watson LIMS (Sistema de gestión de información de laboratorio) versión 7.2 (Thermo Electron Corporation, Reino Unido). Todas las estadísticas (media, desviación estándar (DE), CV (%) y RE (%) presentadas se basan en números informados de la base de datos original. El manejo de datos para el cálculo del punto de corte se analizó utilizando SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., 2002).

Resultados

20

2.1 Rango de calibración y curvas estándar de control positivo

25 **[0131]** Las concentraciones óptimas de ensayo de TP biotinilado y sulfo-TAG fueron 0,0625 µg/ml y 0,0313 µg/ml, respectivamente (datos no mostrados). Después de un análisis de los datos obtenidos del rango de concentración extendido, el rango de calibración se relleno a 8 concentraciones en el rango de 2,50 ng/mL a 7.500 ng/ml para ambas especies, véase la Figura 14 para curvas representativas de control positivo estándar. Los datos brutos se procesaron en Watson LMS versión 7.2, utilizando un algoritmo logístico de 5 parámetros (estimación automática, 5PL) con un factor de ponderación de $1/F^2$. Las curvas de calibración ajustadas al método de regresión 5PL mostraron coeficientes de correlación $>0,998$ para ambas especies. En la Tabla 4 se muestra un resumen de la precisión acumulada entre ensayos (% RE) y precisión (% CV) de las concentraciones calculadas de nuevo de los patrones de calibración. La precisión acumulada (% RE) y la precisión (% CV) de los valores calculados por detrás estaban dentro del 20% de la concentración nominal dentro del rango de 25 ng a 7.500 ng para ambas especies, siendo 25 ng el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y 7.500 ng como límite superior de cuantificación (ULOQ).

35 2.2 MRD y selectividad

40 **[0132]** Se requirió una dilución de suero mínima de 1 en 10 para ambas especies en todas las muestras antes del análisis ya que no hubo diferencias significativas observadas entre el tampón (0% de matriz) y las curvas de calibración de suero a esta dilución (Figura 15).

45 **[0133]** Las recuperaciones medias para los anticuerpos anti-TP se dispararon en suero de ratón a 70 ng/ml y 7.000 ng/mL fueron 117,9% y 93,2% respectivamente, y la variabilidad en la recuperación entre las muestras individuales, como se determina por el CV fueron 10,7% y 5,5%, respectivamente. La inhibición media para los anticuerpos anti-TP incorporados en el suero de ratón a 70 ng/ml y 7.000 ng/ml y preincubados con TP frente a las muestras enriquecidas preincubadas en el tampón de ensayo fueron del 52,0% y del 96,2%, respectivamente. La variabilidad en la recuperación entre las muestras individuales, según lo determinado por CV fue del 9,0% y 0,4% para los picos de 70 ng y 7.000 ng, respectivamente (Tabla 5).

50 **[0134]** El efecto de la variabilidad de suero, utilizando lotes de diez animales diferentes, desde ambas especies, sobre la fiabilidad del método se muestra, por tanto, a ser insignificante.

2.3 Punto de corte y sensibilidad del ensayo

55 **[0135]** Para establecer el umbral para un resultado positivo, se determinó la distribución de señal para muestras de suero blanco individuales para ambas especies. La prueba de Shapiro-Wilk fue significativa para los datos de muestra de ratón, y aún fue significativa después de la transformación de raíz y raíz cuadrada. Después de una evaluación de los datos no transformados, se excluyó la muestra 15 de suero de ratón ya que el residuo estudiado fue mayor que +3. La prueba de Shapiro-Wilk se volvió a aplicar y todavía era significativa sin transformación y después de la transformación de registro y raíz cuadrada. Por lo tanto, se aplicó un enfoque no paramétrico.

60

65 **[0136]** Después de una evaluación de los datos no transformados usando un diagrama de caja, las muestras de suero de ratón 14 y 15 se consideraron atípicas y se excluyeron. El punto de validación de corte para los datos de matrices de detección del ensayo se calculó como 412,17 (el 95° percentil de los datos transformados para todos los resultados). La baja concentración de QC se calculó como la concentración media de punto de corte + $(2,33 \times DE) = 210,0$ ng/ml.

[0137] Hubo evidencia de diferencias estadísticamente significativas entre los medios para los efectos de placa y día ($p < 0,001$), pero no para el analista ($p = 0,368$) y, por lo tanto, se requirió un punto de corte de cribado flotante. El factor de corrección para el punto de corte de cribado se estimó en 201,67 y esto se aplicó a ensayos posteriores.

[0138] La prueba de Shapiro-Wilk no fue significativa para los datos de muestra del perro. Tras una evaluación de los datos no transformados, se excluyó la muestra 1 de suero de perro ya que el residuo estudiado fue mayor que +3. Una vez que se excluyó el valor atípico, se reaplicó la prueba de Shapiro-Wilk y no fue significativa. El punto de corte de validación para los datos de matrices de selección del ensayo se calculó como 263,64. La baja concentración de QC se calculó como la concentración media de punto de corte + $(2,33 \times DE) = 44,4$ ng/ml.

[0139] Hubo evidencia de diferencias estadísticamente significativas entre los medios para los efectos de placa y día ($p < 0,001$) pero no analista ($p = 0,247$). También hubo evidencia de que las varianzas fueron diferentes entre los grupos ($p = 0,002$ prueba de Levene) y, por lo tanto, se requirió un punto de corte dinámico. Como la prueba de Levene fue significativa, cada analista se analizó por separado.

[0140] Para el analista 1 hubo evidencia de diferencias estadísticamente significativas entre los medios para el día y la placa de efectos ($p \leq 0,002$). También hubo evidencia de que las varianzas eran diferentes entre los grupos ($p = 0,006$ prueba de Levene) y, por lo tanto, se requirió un punto de corte dinámico para el Analista 1. No se realizaron cálculos adicionales para este analista, ya que no fueron necesarios para futuros estudios.

[0141] Para el Analista 2, hubo evidencia de diferencias estadísticamente significativas entre los medios para el día y los efectos de placa ($p < 0,001$). No hubo evidencia de que las varianzas fueran diferentes entre los grupos ($p = 0,188$ prueba de Levene) y, por lo tanto, se requirió un punto de corte flotante para este analista. El factor de corrección para el punto de corte de cribado se estimó en 70,38 y esto se aplicó a ensayos posteriores.

[0142] Para los cálculos de puntos de corte de cribado, las inspecciones visuales de los datos de ratón y perro revelaron distribuciones normales. Tras las evaluaciones de los datos transformados, se excluyó la muestra de suero canina 11 (analista 2, placa 1 en el día 3) ya que el residuo estudiado fue menor que -3, y la muestra de suero canina 1 (analista 1, placa 2 en el día 3) ya que el residuo estudiado fue mayor que +3. Ninguno de los datos del ratón fue excluido. No hubo pruebas de diferencias estadísticamente significativas entre los promedios para los analistas, las placas o los efectos de días para los ensayos de ratón y perro. Se calculó que los puntos de corte de especificidad fijos eran 37,12% y 31,41% de inhibición en los sueros de ratón y perro, respectivamente.

2.4 Precisión y corrección

[0143] La precisión de los métodos bioanalíticos se evaluó determinando el CV de las concentraciones medidas de anticuerpos anti-TP después del análisis de muestras de QC de validación. La reserva estándar de control positivo primario (0,518 mg/ml) se diluyó 1 en 74 con suero de control negativo (ratón o perro, según corresponda) para formar la muestra de alto QC (7.000 ng/ml). La muestra de QC medio (1.000 ng/ml) se formó por dilución de la muestra de alto QC con el suero de control negativo apropiado. La muestra de QC bajo (concentraciones de 210 ng/ml para el ratón y 44,4 ng/ml para el perro) se formó mediante la dilución de la muestra de QC medio con el suero de control negativo apropiado.

[0144] Las precisiones de concentración de intraensayo para cada especie se muestran en la Tabla 6. Las mediciones de imprecisión media, como indican los CV, oscilaron entre el 1,1% y el 8,0% para la matriz de suero de ratón y del 1,9% al 2,5% para el suero de perro matriz.

[0145] La precisión entre ensayos para las concentraciones se muestra en la Tabla 7 para ambas especies. Las mediciones de imprecisión media, según lo indicado por los CV, estaban todas dentro de $\pm 20\%$, y las medidas de exactitud media, según lo indicado por el RE, oscilaron entre -1,6% a 6,7% para la matriz de suero de ratón y -13,0% a -2,5% para la matriz de suero de perro.

2.5 Deriva del ensayo

[0146] La deriva del ensayo no se observó para ninguna de las especies. La diferencia de medias en las lecturas de respuesta del instrumento y/o las concentraciones de las muestras de QC de validación al comienzo y al final de la placa de ensayo se encontraban dentro del 6-20%, cuando se comparaban entre sí (datos no mostrados).

2.6 Estabilidad

[0147] Los anticuerpos anti-TP fueron estables tanto en suero de ratón como de perro a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) durante 2 horas, se diluyeron en tampón a temperatura ambiente durante 1 hora (Tabla 7) y después de 3 ciclos de congelación/descongelación (Tabla 8).

2.7 Robustez

[0148] Los resultados de precisión de intraensayo del ensayo de robustez estaban dentro de los criterios de aceptación después de que el tiempo de ensayo se extendió a otros 15 minutos por hora en cada etapa de incubación. Los resultados también estuvieron de acuerdo con las mediciones entre ensayos de ensayos realizados sin tiempos de incubación prolongados. Los valores medios de concentración observados para las muestras de QC de validación expresadas como RE media oscilaron entre -8,7% y 5,1%. El crecimiento, por lo tanto, de los tiempos de incubación en 15 minutos no tuvieron un efecto marcado en el rendimiento del ensayo y se verifica la solidez para los tiempos de incubación probados (Tabla 9).

2.8 Prozona

[0149] Para ambas matrices de perros y los sueros de ratón, prozona no se observó en el ensayo hasta una concentración de anticuerpo anti-TP de suero entero de 25900 ng/ml a 3,5 veces mayor que el estándar de concentración positiva más alta (datos no mostrados).

Discusión

[0150] El objetivo de este estudio consistió en describir el desarrollo y la validación de un método ECL de inmunoensayo de puente para la medición de anticuerpos anti-TP en sueros de perros y ratones. Se seleccionó un formato de inmunoensayo puente ECL debido a las ventajas de no ser específico de la especie y tener el potencial de detectar todos los isotipos y clases de anticuerpos producidos en una respuesta inmune. Los procedimientos analíticos se desarrollaron de acuerdo con las recomendaciones actuales para el diseño y la optimización de los inmunoensayos utilizados en la detección de anticuerpos del huésped contra proteínas terapéuticas y productos de biotecnología. Se investigaron la idoneidad del control positivo, el punto de corte del ensayo y la sensibilidad, la selectividad y la MRD, la precisión y exactitud intra e interensayos, la robustez, la prozona y la estabilidad. Los resultados demuestran que el ensayo es altamente preciso, correcto, sensible y robusto para la cuantificación de anticuerpos anti-TP en suero de ratón y perro.

Tabla 4: Resumen de precisión y corrección para los valores calculados a posteriori de los patrones de control positivo en sueros negativos de ratón y perro (inter-ensayo)

Especies	Concentración (ng/ml)							
	2,50	7,50	25,0	75,0	250	750	2.500	7.500
Ratón								
Media	5,15	7,22	26,0	77,1	252	726	2.540	7.480
DE	4,25	3,0	4,3	5,4	11	18	80	230
CV (%)	82,4	41,6	16,5	7,0	4,5	2,5	3,2	3,0
RE (%)	106,1	-3,7	3,8	2,9	0,7	-3,2	1,7	-0,3
n	29	47	49	50	50	50	50	50
Perro								
Media	2,59	7,55	26,4	77,2	249	733	2.520	7.510
DE	1,57	2,66	1,7	3,4	7	16	70	200
CV (%)	60,4	35,2	6,3	4,4	2,6	2,1	2,7	2,6
RE (%)	3,8	0,7	5,5	3,0	-0,3	-2,2	0,9	0,1
n	24	48	52	52	52	52	52	52

Tabla 5: Recuperación de picos después de la preincubación en ausencia y presencia de TP libre

Especies	Pico (ng/ml)	Respuesta de muestra tratada (ng/ml) Media ± DE*	Recuperación (%) Media ± DE* CV	Respuesta en muestra tratada con TP (ng/ml) Media ± DE*	Inhibición (%) Media ± DE* CV
Ratón	70	105,6 ± 35,4	117,9 ± 12,7 10,7	367,7 ± 98,5	52,0 ± 4,7 9,0
	7.000	6.545,8 ± 356,3	93,2 ± 5,1 5,5	1.477,2 ± 262,7	96,2 ± 0,4 0,4
Perro	70	87,9 ± 14,5	112,0 ± 15,9 14,2	207,7 ± 12,2	46,7 ± 3,9 8,4
	7.000	7.310,0 ± 1.011,0	104,3 ± 14,4 13,8	900,8 ± 109,3	96,1 ± 0,2 0,2

* n=12

Tabla 6: precisión y corrección del ensayo

Especies	Concentración (ng/ml)	Intra-ensayo Media \pm DE* (ng/ml)	Intra-ensayo CV (%)	Inter-ensayo Media \pm DE* (ng/ml)	Inter-ensayo CV (%) RE (%)
Ratón	QC bajo 210	235 \pm 3	1,1	224 \pm 19	8,4 6,7
	QC medio 1.000	1.133 \pm 91	8,0	1.060 \pm 90	8,6 6,1
	QC alto 7.000	7.710 \pm 96	1,3	6.890 \pm 360	5,2 -1,6
Perro	QC bajo 44,4	43,1 \pm 1,0	2,3	43,3 \pm 5,2	12,1 -2,5
	QC medio 1.000	871 \pm 22	2,5	870 \pm 70	8,0 -13,0
	QC alto 7.000	6.520 \pm 125	1,9	6.660 \pm 480	7,3 -4,8
* n=3					

Tabla 7: Estabilidad de anticuerpos anti-TP a tres concentraciones en sueros de ratón y perro limpios y diluidos a temperatura ambiente

Especies	Muestra QC (ng/ml)	Media \pm DE concentración (ng/ml)*		
		0 horas suero	2 horas suero	1 hora diluido
Ratón	QC bajo 210	235 \pm 3	249 \pm 5	260 \pm 22
		1,1	2,1	8,4
		11,7	18,6	23,8
	QC medio 1.000	1.130 \pm 90	1.100 \pm 60	1.200 \pm 20
		8,0	5,0	1,7
		13,3	9,7	20,0
	QC alto 7.000	7.710 \pm 100	8.080 \pm 310	8.590 \pm 160
		1,3	3,9	1,9
		10,1	15,5	22,8
Perro	QC bajo 44,4	43,1 \pm 1,0	43,0 \pm 2,2	40,0 \pm 2,2
		2,3	5,0	5,4
		-2,9	-3,2	-9,9
	QC medio 1.000	871 \pm 22	8,55 \pm 11	876 \pm 30
		2,5	1,3	3,4
		-12,9	-14,5	-12,4
	QC alto 7.000	6.520 \pm 130	6.630 \pm 150	6.540 \pm 90
		1,9	2,3	1,4
		-6,8	-6,7	-6,6
*n = 3				

Tabla 8: Estabilidad del anticuerpo anti-TP en tres concentraciones en suero de ratón y perro después de ciclos repetidos de congelación-descongelación

Especies	Muestra QC (ng/ml)	Media ±DE concentración (ng/ml)*		
		1 ciclo congelación-descongelación n	2 ciclos congelación-descongelación	3 ciclos congelación-descongelación
Ratón	QC bajo 210	240 ± 6 2,4 16,0	240 ± 4 1,3 14,1	230 ± 25 10,8 9,4
	QC medio 1.000	1.020 ± 130 12,5 2,2	1.010 ± 20 1,5 1,3	1.050 ± 20 1,6 5,0
	QC alto 7.000	7.520 ± 390 5,2 7,4	7.770 ± 90 1,1 11,0	7.940 ± 70 0,9 13,5
Perro	QC bajo 44,4	43,1 ± 1,0 2,3 -2,9	43,0 ± 2,2 5,0 -3,2	40,0 ± 2,2 5,4 -9,9
	QC medio 1.000	871 ± 22 2,5 -12,9	8,55 ± 11 1,3 -14,5	876 ± 30 3,4 -12,4
	QC alto 7.000	6.520 ± 130 1,9 -6,8	6.630 ± 150 2,3 -6,7	6.540 ± 90 1,4 -6,6

*n = 3

Tabla 9: Robustez del ensayo

Especies	Muestra QC (ng/ml)	QC	QC delantero (media)*	Deriva (media)*	QC	Media ± DE* CV(%) RE(%)
Ratón	QC bajo 210		231	205		218 ± 18 8,4 3,8
	QC medio 1.000		1.040	1.010		1.025 ± 21 2,1 2,5
	QC alto 7.000		6.380	6.510		6.445 ± 92 1,4 -7,9
Perro	QC bajo 44,4		45,7	47,6		46,7 ± 1,3 2,9 5,1
	QC medio 1.000		909	917		913 ± 6 0,6 -8,7
	QC alto 7.000		6.820	6.740		6.780 ± 57 0,8 -3,1

*n = 2

Ejemplo 5 - Evaluación de toxicidad preclínica de fosforilasa de timidina encapsulada en eritrocitos en ratones BALB/c y perros Beagle

[0151] El objetivo de los estudios presentados aquí consistió en evaluar el potencial tóxico sistémico de EE-TP en ratones BALB/c y perros Beagle en apoyo del desarrollo clínico de EE-TP. El ratón y el perro fueron elegidos como

la primera y segunda especie de prueba, respectivamente, debido a su aceptación como predictores de cambios tóxicos en el hombre y el requisito de una especie de roedor y no roedor por parte de las agencias reguladoras. El ratón BALB/c se utilizó debido a la experiencia previa con la administración de EE-TP a esa cepa. La cepa Beagle se empleó debido a los datos de control históricos disponibles y también porque el perro también tiene un volumen de sangre suficiente para permitir la formulación de EE-TP usando sangre autóloga (Chalmers, 1985; Sprandel *et al.*, 1981). Los estudios se diseñaron para cumplir con los requisitos de las pautas regulatorias y se realizaron de acuerdo con los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio actuales, reconocidas internacionalmente.

[0152] Una evaluación toxicológica estándar se realizó que incluía signos diarios clínicos, peso corporal semanal y el consumo de alimentos, y al final del estudio exámenes oftálmicos, patología clínica, peso de los órganos, y la necropsia macroscópica completa en todos los animales y el examen microscópico de luz de una gama de tejidos.

Materiales y método

1.1 Materiales de prueba y control

[0153] La fosforilasa de timidina E. coli recombinante fue fabricada para este estudio por Sigma-Aldrich (Israel) y se suministró formulada en un tampón de estabilización dihidrógeno ortofosfato de potasio con una actividad específica de 178-211 proteína UI/mg. El banco de células maestro y de trabajo se almacena en el Jerusalem Plasmid Bank. La especificación y los resultados de liberación del análisis por lotes para la enzima recombinante empleada en estos estudios se resumen en la Tabla 10. El material de prueba, EE-TP se formuló mediante encapsulación en eritrocitos de perro o ratón de la siguiente manera:

[0154] El estudio perro siguió el régimen clínico propuesto, en el que la sangre autóloga fue retirada de un sujeto a la transformación en prueba o material de control y después se administra de nuevo al mismo sujeto; un día antes de cada ocasión de dosificación, se recogieron 50 ml de sangre a través de una vena adecuada del perro apropiado en vacutainers con heparina de litio anticoagulante y transportado a St. George's, Universidad de Londres. El EE-TP se formuló mediante la encapsulación de la fosforilasa de timidina dentro de los eritrocitos usando nuestro proceso establecido de diálisis hipoosmótica reversible (Chalmers, 1985; Bax *et al.*, 1999). Se usaron técnicas asépticas y materiales estériles en todas partes. Brevemente, la sangre se centrifugó a 1.100 x g durante 10 minutos, y el plasma y la capa leucocitaria fueron retirados y retenidos para su uso posterior. Los eritrocitos se lavaron dos veces en frío (4°C) salina tamponada con fosfato (PBS; KCl 2,68 mM, 1,47 mM KH₂PO₄, NaCl mM 136,89, 8,10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) Los eritrocitos lavados y envasados se mezclaron a continuación con PBS frío que contiene 200 UI/ml de fosforilasa de timidina para formar una suspensión con un hematocrito del 70%. La suspensión celular se colocó en una bolsa de diálisis con un corte de peso molecular de 12.000 Da y luego se dializó contra 40 volúmenes de tampón hipoosmótico (KH₂PO₄ 5 mM, K₂HPO₄ 5 mM, pH 7,4) a 4°C. °C con rotación a 8 rpm durante 90 minutos. Los eritrocitos lisados se cerraron de nuevo por diálisis frente a 40 volúmenes de PBS suplementado con MgCl₂, 5 mM, adenosina 5 mM y glucosa 5 mM (SPBS, pH 7,4) a 37°C con rotación a 8 rpm durante 60 minutos. Los eritrocitos cargados con enzimas se lavaron luego tres veces en SPBS, con centrifugación a 100 x g durante 20 minutos. Las células mostraron morfología normocítica y normocrómica y se caracterizaron por los siguientes parámetros: volumen celular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), concentración de hemoglobina extracelular (Hb), timidina encapsulada y actividad de fosforilasa extracelular (Tabla 11). Los parámetros hematológicos MCV, MCH y MCHC se determinaron usando un analizador de hematología Woodley MS4-5. Para la determinación de la concentración de Hb extracelular y de la actividad de fosforilasa de timidina, se obtuvieron fracciones extracelulares ajustando el hematocrito de las células lavadas y empaquetadas al 50% con PBS, seguido de centrifugación a 1.000 x g durante 10 minutos. La Hb se midió por espectrofotometría a 542 nm usando Reactivo de Drabkin (Sigma-Aldrich, Reino Unido) y la actividad de la fosforilasa de timidina se determinó como se describe a continuación. El material de control (eritrocitos con carga simulada) se formuló sometiendo eritrocitos al mismo proceso de diálisis hipoosmótica reversible, pero en ausencia de fosforilasa de timidina. Recuperación celular para EE-TP y las células cargadas fue de 62 ± 1,2% y 59,2 ± 1,3%, respectivamente. Las células de plasma y blancas retenidas desde la primera etapa de centrifugación y el exceso de eritrocitos a los requisitos del procedimiento de encapsulación se añadieron de nuevo a la prueba o al material de control para proporcionar un volumen de infusión de 43-50 ml. Este paso se incluyó para imitar el régimen utilizado en el entorno clínico para evitar el agotamiento de los componentes sanguíneos importantes y mantener el volumen sanguíneo.

[0155] En el estudio con ratones, para evitar las complicaciones del sobremuestreo, se usó sangre alogénica (en lugar de sangre autóloga) obtenida de ratones donantes de la misma cepa para preparar el material de prueba y control. Un volumen predeterminado de sangre alogénica en heparina de litio se suministró un día antes de la dosificación y se procesó como material de prueba y control. Se utilizó la misma técnica de diálisis hipoosmótica reversible que la descrita para los eritrocitos caninos, excepto que todos los lavados (pre y post diálisis) y el resellado isoosmótico se realizaron utilizando SPBS que contenía glutatión 3 mM y el hipoosmótico e isoosmótico. se realizaron etapas de diálisis frente a 30 volúmenes de tampón (Murray *et al.*, 2006). Recuperaciones de células fueron 36,7 ± 1,8 (n = 12) y 37,8 ± 2,1% (n = 9) respectivamente, para EE-TP y células cargadas con simulación. Las células mostraron morfología normocítica y normocrómica y tenían las características descritas en la Tabla 11. Después de la formulación, se suspendieron dos volúmenes de material de prueba o control en 1 volumen de

plasma retenido.

[0156] Para ambas especies, una hora después de la formulación, los materiales de prueba y control se enviaron a temperatura ambiente a Huntingdon Life Sciences para su administración.

[0157] La estabilidad de la actividad de la fosforilasa de timidina encapsulada se evaluó sobre el tiempo de retardo máximo propuesto entre la formulación y la infusión en el ajuste pre-clínica por análisis de la actividad de la fosforilasa de timidina después de 0, 1,4, 17 y 24 horas de almacenamiento a 4°C y 22°C. Se almacenaron alícuotas de 100 ml de EE-TP preparadas a partir de eritrocitos de perro y ratón en microtubos cerrados a la temperatura apropiada y luego se congelaron después del tiempo de incubación apropiado hasta el análisis.

1.2 Análisis de fosforilasa de timidina

[0158] La actividad fosforilasa de timidina se determinó mediante cuantificación de la tasa de formación de timina usando un método (manuscrito en preparación) de cromatografía líquida de alto rendimiento validado (HPLC). El método es lineal sobre una concentración de timina de 5 a 500 nmol/ml, y tiene un límite de detección y un límite de cuantificación de 0,60 nmol/ml y 1,80 nmol/ml, respectivamente. Los análisis se realizaron para verificar la actividad de la actividad de fosforilasa de timidina celular y extracelular en EE-TP y para confirmar la ausencia de actividad enzimática en el material de control. Los lisados (descongelados a partir de eritrocitos -80°C y las fracciones extracelulares se diluyeron 1:1420 y 1:10, respectivamente con tampón TRIS (125 mM, pH 7,4). A continuación, se añadieron 25 µl del lisado o fracción extracelular de eritrocitos diluidos a 100 µl de tampón de fosfato (100 mM, pH 6,5) y 25 µl de timidina estándar (10 mM), se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. La reacción se terminó con 25 µl de ácido tricloroacético al 40% (TCA). Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se lavó dos veces con éter di-etilo saturado con agua durante 2 minutos en un agitador para eliminar el TCA. Se inyectó un volumen de muestra de 10 µl en la HPLC. Se utilizó una columna de 5 ODS (125 x 4,6 mm i.d.) en un sistema isocrático a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min con un tiempo de ejecución de 8 minutos. El tampón consistió en acetato de amonio (40 mM) con el agente de emparejamiento de iones sulfato de tetrabutilamonio (5 mM), ajustado a pH 2,70 con HCl. La traza de HPLC se registró a 254 nm y 0,1 AUFS. Los metabolitos se identificaron mediante la comparación de espectros con patrones puros.

1.3 La cría de animales

[0159] Este aspecto de los estudios se realizó en Huntingdon Life Sciences, Reino Unido. Todos los procedimientos experimentales en vida se realizaron de conformidad con la Ley de Animales (Procedimientos científicos) de 1986. Las viviendas para animales cumplen con el Código de prácticas para la carcasa y cuidado de animales utilizado en procedimientos científicos en el Ministerio del Interior del Reino Unido. Los diseños del estudio fueron revisados y aprobados por los titulares de las Licencias de proyectos de la oficina central en Huntingdon Life Sciences.

[0160] **Ratones.** Los ratones BALB/c se compraron de un criador comercial y se aclimataron durante 18 días. Al comienzo del tratamiento, los ratones tenían 10 semanas de edad, con pesos corporales de 21,5 a 26,7 g para los hombres y de 18,7 a 22,6 g para las mujeres. Los animales fueron alojados hasta tres por jaula para las mujeres y, singularmente, para los hombres. La temperatura y la humedad relativa se mantuvieron dentro del rango de 19 a 23°C y de 40 a 70%, respectivamente. La iluminación artificial se controló para proporcionar un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los alimentos (dieta de mantenimiento número 1 de ratas y ratones) y agua se administraron *ad libitum*.

[0161] **Perros.** Los perros Beagle de raza pura de linaje conocido se obtuvieron de un criador comercial y se inocularon contra el virus del moquillo canino, virus de hepatitis canino, virus de parainfluenza canino, parvovirus canino, *Leptospira canina*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* (mediante inyección subcutánea de DHPPi y *Leptospira*) y Vacuna de Bordetella bronchiseptica (Intrac® administrada por vía intranasal). A su llegada, los animales también recibieron un examen veterinario y recibieron un tratamiento oral con el antihelmíntico "Drontal Plus®" (praziquantel, pirantel embonato y febantel.) Se permitió que los perros se aclimataran a las condiciones de la vivienda durante al menos cuatro semanas antes del inicio del tratamiento. Al inicio del tratamiento, los perros tenían aproximadamente de 24 a 27 semanas de edad y pesaban de 9,6 a 11,8 kg para los machos y de 7,07 a 10,0 kg para las hembras. Los animales se alojaron en tríos del mismo sexo y grupo de dosis, excepto por el período inmediatamente anterior a cada administración. Cada pluma individual se equipó con calefacción por suelo radiante y se utilizó aserrín de madera blanqueada como cama y se cambió a diario. La temperatura ambiente se mantuvo en el rango de 15 a 24°C y la extracción de aire mediante un sistema equilibrado para proporcionar aproximadamente 12 cambios de aire por hora. Se controló la iluminación para dar un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. A cada perro se le ofrecieron 400 g de una dieta estándar peletizada en seco (Teklad 2021 Dieta de mantenimiento de perro) diariamente. La comida se ofreció a media mañana y se permitió a cada perro tener acceso a ella durante al menos una hora, después de lo cual se retiró cualquier alimento no comido y posteriormente se pesó y se desechó. El agua se dio *ad libitum*.

1.4 Administración de materiales de prueba y control

[0162] Para ambas especies, se eligió una vía de administración de inyección en bolo intravenosa intermitente para simular las condiciones de administración clínica. Los ratones recibieron una inyección intravenosa en bolo a una dosis en volumen de 4 ml/kg/ocasión, usando una jeringa graduada y una aguja insertada en la vena de la cola. En los perros, el acceso venoso se obtuvo a través de venas cefálicas o safenas, alternadas en cada administración. Luego se conectó un catéter preparado con un pequeño volumen de solución salina a un controlador de jeringa (bomba de infusión Harvard Apparatus PHD2000) y se administró todo el volumen de sangre al perro del que procedía a una velocidad de infusión de 10 ml/minuto (excepto para los hombres del Grupo 3 en el Día 15, donde se utilizó una velocidad de infusión de 5 ml/minuto).

[0163] El estudio consistió en un control (Grupo 1) y dos grupos tratados (grupos 2 y 3) para cada especie y que fueron tratados como se indica en la Tabla 12. Los grupos 1 y 3 fueron tratados dos veces por semana. El grupo 2 fue tratado una vez cada dos semanas, de acuerdo con el régimen clínico propuesto, con una dosis máxima propuesta de 200 UI/kg. La administración dos veces por semana al Grupo 3 tenía como objetivo lograr una exposición aproximadamente cuatro veces mayor que la dosis clínica propuesta para lograr un margen de seguridad satisfactorio para los ensayos clínicos.

1.5 Observaciones seriales

[0164] Los animales se inspeccionaron visualmente al menos dos veces al día para evidencia de mala salud o reacción al tratamiento. En días de dosificación, se registraron observaciones detalladas en los siguientes tiempos en relación con la administración de la dosis: dosis previa, inmediatamente después de la infusión, entre 0,5 y 2 horas después de la finalización de la dosificación, y lo más tarde posible en la jornada laboral. El peso corporal de cada animal se registró semanalmente (ratón) y dos veces por semana (perro) durante el período de aclimatación, el día en que comenzó el tratamiento (Día 1), dos veces a la semana durante el período de tratamiento y antes de la necropsia. El peso de los alimentos suministrados a cada jaula de ratones y de cada perro individual, el peso que quedaba, y una estimación de cualquier derrame se registraron durante el período de aclimatación y durante todo el estudio. Para el ratón, el consumo semanal por animal (g/animal/semana) se calculó para cada jaula.

[0165] Los exámenes oftalmoscópicos se realizaron antes de la dosificación y antes de la eutanasia programada de cada animal. Antes de cada examen, se dilataron las pupilas de cada animal con una solución oftálmica de tropicamida (Midriacilo). Se examinaron los anejos, la conjuntiva, la córnea, la esclerótica, la cámara anterior, el iris (pupila dilatada), la lente, el vítreo y el fondo.

[0166] En el perro, se registraron los trazados electrocardiográficos de todos los animales en una ocasión durante el período de pretratamiento para las tres derivaciones de miembro estándar (I, II, III) y las tres derivaciones de miembro aumentadas (aVR, aVL y aVF). Se obtuvieron trazados adicionales durante la semana 3, dos y 24 horas después de la infusión para el grupo 2, y durante la semana 4, dos y 24 horas después de la infusión para los grupos 1 y 3. Las huellas se examinaron visualmente por cualquier anomalía de los complejos eléctricos y la frecuencia cardíaca fue registrada.

1.6 Patología clínica

[0167] Se recogieron muestras de patología clínica para la evaluación de la hematología y química clínica. En el perro, estos se obtuvieron a través de la vena yugular antes del inicio del tratamiento y durante la semana 4 antes de la dosificación. Se tomaron muestras adicionales para hematología en el día 14 de todos los perros, y en el día 21 solo para perros machos. Se tomaron muestras de sangre de ratón en la terminación solamente; los animales se mantuvieron bajo anestesia general ligera inducida por isoflurano y se extrajeron muestras de sangre del seno retroorbital. Los parámetros hematológicos se midieron en los primeros cinco ratones por sexo por grupo, y los parámetros de química clínica se midieron en los segundos cinco ratones por sexo por grupo.

[0168] Los parámetros hematológicos se analizaron en sangre recogida en tubos que contenían EDTA como anticoagulante usando un analizador de hematología Bayer Advia 120 e incluyeron: hematocrito (Hct), Hb, recuento de eritrocitos (RBC), recuento de reticulocitos, MCH, MCHC, MCV, total recuento de glóbulos blancos (WBC), recuento diferencial de WBC (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células grandes no teñidas) y recuento de plaquetas. En el ratón, se obtuvieron muestras de médula ósea de la tibia y el fémur durante la necropsia para el examen de la hematología de la médula ósea. Los frotis preparados fueron más secos, se fijaron en metanol y se tiñeron usando un procedimiento de romanowsky.

[0169] Parámetros químicos clínicos fueron examinados en plasma (separado de la sangre que había sido recogida en heparina de litio) usando una Roche PP Analizador Modular e incluyeron: fosfatasa alcalina, aminotransferasa de alanina, aminotransferasa de aspartato, bilirrubina total, urea, creatinina, glucosa, Total colesterol, triglicéridos, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo inorgánico, proteína total y albúmina. En el perro, las fracciones proteicas electroforéticas albúmina, $\alpha 1$ globulina, $\alpha 2$ globulina, β globulina y γ globulina se procesaron utilizando Helena SPIFE 3000 con gel de agarosa y escaneado con un densitómetro. La relación albúmina/globulina se calculó a partir de la concentración de proteína total y se analizó la concentración de albúmina.

[0170] Se midieron los parámetros de coagulación, el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada para el perro en la sangre recogida en el citrato usando un analizador ACL 9000.

[0171] La orina durante la noche producida se recogió de todos los perros antes de que comenzara el tratamiento y durante la semana 4. Los perros se colocaron en jaulas individuales de metabolismo sin comida ni agua y la orina se recogió durante aproximadamente 16,5 horas. Las muestras se examinaron en cuanto a apariencia, volumen, pH, gravedad específica, proteína, glucosa, cetonas y pigmentos biliares. Se realizó un examen microscópico del sedimento de orina mediante la centrifugación de una alícuota de orina y la tinción del depósito resultante con la tinción de Kova antes de extenderlo en un portaobjetos de microscopio.

1.7 Anticuerpos anti-fosforilasa de timidina

[0172] Se recogieron muestras de sangre para el análisis de anticuerpos anti-fosforilasa de timidina de todos los ratones y perros en tubos de suero estándar durante el pretratamiento, en el día 17 (solo perros machos) y en la terminación. Después de la separación por centrifugación a 2000 g a 4°C durante 10 minutos, el suero se recogió en alícuotas y se congeló a -70°C hasta el análisis. Las muestras se analizaron para anticuerpos anti-fosforilasa de timidina utilizando métodos de detección de electroquimioluminiscencia de GLP validados (Ejemplo 4).

1.8 Necropsia e histología

[0173] Todos los animales fueron sacrificados por eutanasia ya sea 1 día (perros) o 2 días (ratones) después de la administración de la última dosis; los ratones se sacrificaron mediante asfixia con dióxido de carbono, y los perros mediante una sobredosis de solución de pentobarbitona sódica (200 mg/ml) mediante inyección intravenosa y exanguinación posterior. Se realizó un examen macroscópico completo de los tejidos. Se registró cualquier anomalía en el aspecto o tamaño de cualquier órgano y tejido y las muestras de tejido requeridas se conservaron en el fijador apropiado. Los testículos se fijaron en fluido de Davidson modificado y los ojos se fijaron en el fluido de Davidson antes de transferirlo al alcohol metilado industrial al 70%. Todos los demás tejidos se conservaron en formalina tamponada neutra al 10%. Los tejidos a examinar se deshidrataron, se incrustaron en cera de parafina, se seccionaron con un espesor de aproximadamente 4 a 5 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los siguientes tejidos fueron examinados microscópicamente: suprarrenales, cerebro, fémur con articulaciones, corazón, riñones, hígado, pulmones, médula espinal, esternón, estómago, tiroides y útero. Para los órganos bilaterales, se prepararon secciones de ambos órganos. Los hallazgos se informaron como presentes o se les asignó un grado de gravedad. En este último caso, se utilizó uno de los siguientes cinco grados: mínimo, leve, moderado, marcado o grave.

1.9 Análisis estadístico

[0174] Los datos se expresan como \pm DE media o como \pm SEM media. Para los estudios con ratones, los análisis estadísticos se llevaron a cabo por separado para hombres y mujeres. Los datos relacionados con el consumo de alimentos se analizaron en una base de jaula para las mujeres, e individualmente para los hombres. Para todos los demás parámetros, los análisis se llevaron a cabo utilizando el animal individual como la unidad experimental. Las comparaciones fueron del Grupo 1 versa 2 y Grupo 1 versa 3. La secuencia de pruebas estadísticas empleadas para peso corporal, consumo de alimentos, peso de órganos y datos de patología clínica fue en primer lugar un análisis paramétrico si la prueba de Bartlett para la homogeneidad de la varianza (Bartlett, 1937) no fue significativa en el nivel del 1%; los grupos se compararon usando pruebas t, y en segundo lugar un análisis no paramétrico si la prueba de Bartlett todavía era significativa al nivel del 1% después de las transformaciones tanto logarítmicas como de raíz cuadrada; los grupos se compararon usando pruebas de suma de rangos de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945). Para los datos de patología clínica, si el 75% de los datos (en todos los grupos) tenían el mismo valor, por ejemplo c, se realizaron las pruebas exactas de Fisher (Fisher, 1973). Los grupos de tratamiento se compararon utilizando comparaciones por pares de cada grupo de dosis frente al control tanto para los valores $<c$ frente a los valores $\geq c$, como para los valores $\leq c$ frente a los valores $>c$, según corresponda. Para los datos de peso del órgano, el análisis de la covarianza se realizó utilizando el peso corporal terminal como la covariable (Angervall y Carlstrom, 1963). Las comparaciones de tratamiento se realizaron en grupos ajustados para permitir diferencias en el peso corporal que pueden influir en el peso del órgano. Las diferencias significativas entre los grupos de control y tratados se expresan como *p <0,05 y **p <0,01. Debido a los pequeños números en el estudio del perro, no se realizaron análisis estadísticos.

Resultados

2.1 Estabilidad EE-TP y dosis

[0175] El almacenamiento de EE-TP durante hasta 24 horas a temperaturas de 4°C y 22°C no tuvo un efecto significativo sobre la actividad de fosforilasa de timidina asociada a eritrocitos (Figura 16). Las bajas concentraciones de Hb extracelular y las bajas actividades extracelulares de la fosforilasa de timidina demostraron que el EE-TP era estable 24 horas después de la formulación (Tabla 10). El tiempo máximo de retraso entre la formulación EE-TP y la infusión en estos estudios fue de 5 horas. La Tabla 11 muestra las dosis administradas.

2.2 Observaciones clínicas

5 **[0176] Ratón.** Un hombre que recibió EE-TP una vez cada 2 semanas (Grupo 2) murió inmediatamente después de la dosis final el día 29. El examen post mortem no mostró hallazgos importantes, sin embargo, el examen histopatológico reveló una marcada presencia de trombos/émbolos en los pulmones y esto fue considerado como el motivo de la muerte. A partir de la semana 4, se observó una apariencia descuidada para los machos en todos los grupos (incluido el control), acompañada de piloerección para ambos grupos tratados con la sustancia de prueba. Se observó una postura encorvada para los hombres que recibían la administración dos veces por semana. Se observaron colas oscuras, manchas oscuras en las colas y/o costras para todos los grupos (incluido el control) y se consideró que reflejaban la vía de administración intravenosa.

15 **[0177]** No hubo efecto aparente del tratamiento sobre el peso corporal, la ganancia de peso corporal o el consumo de alimentos. Los hallazgos de los exámenes oftalmoscópicos realizaron el pretratamiento y en la semana 4 estuvieron dentro de los límites normales para los animales de esta edad y tensión. No hubo evidencia de un efecto relacionado con el tratamiento en ninguna estructura ocular.

20 **[0178] Perro.** No hubo muertes no programadas durante el estudio. Los animales dosificados una vez cada dos semanas (Grupo 2, dosificado en los días 1, 15 y 29) no mostraron signos clínicos en la primera administración. Sin embargo, en la segunda administración (Día 15) se observó una actividad no transitoria de dosificación en tres hombres y dos mujeres. En la tercera administración (Día 29), se observó una baja actividad de post-dosis transitoria para los tres hombres y tres mujeres. El Día 29, los signos clínicos transitorios adicionales incluyeron: respiración inusual (jadeo) en un macho y una hembra, heces sueltas o líquidas en un macho y una hembra, y vómitos en una hembra. En ocasiones, se observaron encías pálidas durante el estudio para algunos animales.

25 **[0179]** Los varones dosificados dos veces por semana (Grupo 3, se dosifica en los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 y 29) no mostraron signos clínicos de dosificación los días 1 y 4. Desde el día 5 en adelante gomas pálidas fueron notadas para todos los hombres Sin embargo, en el día 11 después de la dosificación, un hombre vomitó, un segundo perro se observó con heces sueltas y el tercer perro fue poco activo con heces sueltas y vómitos. Durante la dosificación del día 15, los tres perros machos estuvieron poco activos durante la administración y esto continuó siendo notorio para un perro hasta el final de la jornada laboral. Se observaron heces sueltas para este perro durante la dosificación y temblores corporales y vómitos después de la dosificación. Como resultado de estos hallazgos, se tomó la decisión de pre-medicar a los perros machos desde el día 18 en adelante con tratamientos antihistamínicos, antiinflamatorios corticosteroides y antieméticos aproximadamente una hora antes de la dosificación. Como resultado, los niveles de signos clínicos se redujeron significativamente en los días 18, 22 y 25 de dosificación, notándose solo una baja actividad post dosis en dos de los perros. Sin embargo, en el día 29, el nivel de baja actividad aumentó para dos perros tanto durante la dosificación como después de la dosificación.

40 **[0180]** Las hembras dosificadas dos veces por semana (Grupo 3) mostraron el mismo rango de signos clínicos que los observados en los hombres, pero en general estos signos aparecieron más adelante en el estudio. El día 15 una hembra fue notada como inestable al final de la dosificación y en el día 18, se notó que otra hembra era poco activa durante la dosificación. Debido a estos hallazgos, ambas hembras recibieron medicación de predosis en tratamientos futuros; a pesar de esto, se observó que ambos animales eran poco activos después de la dosificación en el día 25 y uno volvió a estar menos activo el día 29. Se observaron encías pálidas, pero con una incidencia menor que la observada en los varones de este grupo, pero también se observó en un perro de control.

45 **[0181]** Hubo una mayor incidencia de hematomas y formación de costras en los sitios de inyección de los varones que habían recibido tratamientos dos veces por semana en comparación con el control. No hubo aumentos aparentes en la incidencia dentro de las hembras o dentro de los perros que fueron tratados cada dos semanas.

50 **[0182]** La ganancia media de peso corporal en el grupo en varones y hembras que recibieron tratamientos dos veces por semana (Grupo 3) fue menor que la del control (Grupo 1). La ganancia media de peso corporal en las hembras que recibieron tratamiento cada dos semanas (Grupo 2) también fue menor que la de los controles (Figura 17). Sin embargo, este resultado se debió a una hembra, que era el animal más pequeño en el estudio. Por lo tanto, esta diferencia con el control no se considera relacionada con el tratamiento. No hubo efecto aparente del tratamiento en el consumo de alimentos, exámenes oftalmoscópicos y electrocardiográficos.

2.3 Química clínica y hematología

60 **[0183] Ratón.** La Tabla 12 muestra los resultados de parámetros de química clínica seleccionados para ratones después de recibir tratamiento durante 4 semanas. Se registraron concentraciones superiores de control de colesterol (1,08-1,15 veces más) y triglicéridos (1,62-2,84 veces más) para ambos grupos de varones tratados con EE-TP. En la ausencia de diferencias similares en las mujeres o la patología corroborativa, se consideró que estas concentraciones más altas no tenía ninguna importancia toxicológica. La concentración plasmática de urea fue menor para las mujeres tratadas una vez cada 2 semanas y ambos sexos se trataron dos veces por semana en comparación con el control. Esta diferencia refleja los valores de urea del grupo de control siendo ligeramente más altos que el rango de fondo esperado (percentil 5-95: hembras 5,44 a 7,08 mM) y consecuentemente no se

considera que esté relacionado con la administración de EE-TP. Todas las demás diferencias intergrupales después de cuatro semanas de tratamiento fueron menores o se confirmaron en un sexo y se atribuyeron a la variación biológica normal. Dichos cambios incluyeron las variaciones observadas para la creatinina y el calcio en los varones y la fosfatasa alcalina en las hembras.

[0184] No se observaron cambios en los parámetros hematológicos investigados que se consideraron como un efecto de la administración de EE-TP. La anisocitosis se observó para la mayoría de los animales (incluido el control) y fue más marcada en los hombres. Se observó hemoglobina corpuscular media y hemoglobina media por encima del control para ambos grupos de hembras tratadas y se observó hematocrito inferior al control para las hembras tratadas una vez cada 2 semanas (Tabla 13). En ausencia de una relación de dosis o un hallazgo similar en los hombres, esta diferencia de control se consideró poco probable como un efecto del tratamiento. No se observaron hallazgos microscópicos anormales en la médula ósea.

[0185] Perro. No se observaron cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros de química clínica investigados. Todas las diferencias intergrupales fueron menores y reflejaron tendencias que estaban presentes antes del tratamiento o que carecían de relación de dosis y, por lo tanto, se atribuyen a la variación biológica normal. No se observaron cambios en los parámetros de análisis de orina que se consideraron como efecto del tratamiento. Se aumentó el cloruro urinario y el sodio para dos hombres que recibieron tratamientos dos veces por semana en comparación con los valores de control y pretratamiento. Sin embargo, no se observaron hallazgos similares en las hembras (Tabla 14).

[0186] Investigaciones de hematología realizadas en los días 14 y 21 (sólo los varones) y en la semana 4 revelaron reducciones en el hematocrito, concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos, con un aumento asociado en reticulocitos dentro de todos los grupos, incluyendo los controles, en comparación con pre-tratamiento. Hubo alguna variación en la magnitud de la respuesta entre animales dentro del mismo grupo de tratamiento, la magnitud de estos cambios fue mayor a mitad del estudio (Día 14) y disminuyó, pero aún no volvió a los niveles previos al tratamiento al final del estudio; los animales tratados una vez cada dos semanas fueron menos afectados que los tratados dos veces por semana; las hembras fueron menos afectadas que los varones. Todas las demás diferencias intergrupales fueron menores, las tendencias reflejadas que estaban presentes antes del tratamiento o que carecían de relaciones de dosificación se atribuyeron a la variación biológica normal (Tabla 15). Se observó una reducción en el recuento de plaquetas, en comparación con los controles, el Día 14 y/o el Día 21 (solo varones) para varones y hembras que reciben tratamientos cada dos semanas y para varones y hembras que reciben tratamientos dos veces por semana. Durante la semana 4 se observaron reducciones similares dentro de estos grupos, sin embargo la magnitud de los cambios fue menor y aproximadamente la mitad de los animales tratados una vez cada dos semanas y uno de los animales tratados dos veces por semana retornó a valores similares al pretratamiento (Tabla 15).

2.4 Anticuerpos de anti-timidinfosforilasa

[0187] Las muestras tomadas en el día 29 para todos los ratones y perros tratados con EE-TP fueron positivos para la presencia de anticuerpos no específicos. Se observó un título superior para los ratones tratados dos veces por semana (Grupo 3). No se detectaron anticuerpos en los animales del grupo control. Para el perro, un ensayo confirmatorio mostró la presencia de anticuerpos específicos anti-fosforilasa de timidina para un varón que recibe EE-TP una vez cada dos semanas (Grupo 2) y un varón que recibe EE-TP dos veces por semana (Grupo 3). Para el ratón, se detectó la presencia de anticuerpos específicos anti-fosforilasa de timidina para 7 de 9 hombres y 7 de 10 mujeres que recibieron EE-TP una vez cada dos semanas (Grupo 2) y 4 de 10 hombres y 1 de 10 mujeres que recibieron EE-TP dos veces por semana (Grupo 3).

2.5 Pesos de órganos y patología anatómica

[0188] Ratón. Los pesos del bazo ajustados al peso corporal para ambos sexos tratados dos veces por semana fueron significativamente más altos que el grupo de control ($p < 0,05$ para el varón y $p < 0,01$ para la hembra). Además, los pesos absolutos del bazo fueron mayores que el rango de fondo esperado (percentil 5 - 95: machos 0,089 - 0,103 g, hembras 0,085 - 0,102 g) para todos los animales en el estudio (machos y hembras, ambos grupos de tratamiento y control). Todas las demás diferencias con respecto al control, incluidas las que alcanzaron significación estadística, solo se observaron en un solo sexo, no mostraron relación con la dosis o se consideraron menores. Tales diferencias de control incluyeron bajo cerebro (tratado una vez cada dos semanas, $p < 0,05$) y timo (tratado una vez cada dos semanas, $p < 0,05$; tratado dos veces por semana $p < 0,01$) pesos en hombres.

[0189] El examen macroscópico realizado después de 4 semanas de tratamiento reveló la ampliación del bazo en la mayoría de los animales en todos los grupos, incluido el control. Se observaron áreas oscuras en el sitio parenteral (vena de la cola) en algunos animales en todos los grupos y fueron de origen procedimental. La incidencia y distribución de todos los demás hallazgos fueron consistentes con los antecedentes comunes de ratones BALB/c. Los cambios relacionados con el tratamiento con EE-TP como se observó por microscopía óptica se observaron en los pulmones. Se registraron trombos/émbolos en los pulmones en todos los grupos, incluido el grupo control, acompañados de células inflamatorias perivasculares en animales tratados con EE-TP (Figura 18). Hubo una mayor

incidencia y gravedad observadas para los grupos tratados en comparación con el control, sin embargo, no hubo relación con el número de dosis administradas (Tabla 16). En el sitio de inyección parenteral, se observó inflamación/hemorragia perivascular en todos los grupos. Este hallazgo se correlacionó con la observación de patología macroscópica de colas oscuras en la necropsia y se relacionó con el procedimiento de administración intravenosa y no con EE-TP. No se observaron lesiones microscópicas en el bazo.

[0190] Perro. Para los perros que recibieron tratamientos dos veces por semana (Grupo 3), los pesos del timo de las tres hembras y dos de los tres machos fueron inferiores a los pesos de control. Los pesos cerebrales en los 3 hombres que recibieron tratamientos dos veces por semana (Grupo 3) aumentaron en comparación con los controles. Sin embargo, en ausencia de hallazgos similares dentro de las mujeres o cualquier hallazgo microscópico asociado en el cerebro, estas diferencias de peso se consideran no relacionadas con el tratamiento. Se observó un aumento en el peso del hígado para todos los animales que recibían tratamientos dos veces por semana (Grupo 3) y para los hombres que recibían tratamiento una vez cada dos semanas (Grupo 2). Sin embargo, no hubo correlación microscópica y, por lo tanto, se considera que estas diferencias no están relacionadas con el tratamiento. También se observó un aumento del peso medio del bazo en el grupo para dos de las tres hembras que recibían tratamientos dos veces por semana. No se observó ningún cambio similar en los hombres y no se observó correlación microscópica, por lo que se considera que estas diferencias no están relacionadas con el tratamiento. Todas las demás diferencias intergrupales fueron menores o carecieron de relación de dosis y, por lo tanto, se atribuyeron a la variación biológica normal (Tabla 17).

[0191] El examen macroscópico realizado después de 4 semanas de tratamiento reveló timos más pequeños en las tres hembras y dos de los tres machos que recibieron tratamientos dos veces por semana (Grupo 3). Las áreas rojas perivasculares observadas en algunos sitios parenterales fueron de origen procedimental. La incidencia y la distribución de todos los demás hallazgos fueron consistentes con los antecedentes comunes. Los cambios relacionados con el tratamiento con EE-TP visto por microscopía óptica fueron en el timo de animales a los que se administró la sustancia de prueba dos veces por semana. El timo tenía una atrofia leve a marcada en estos animales (Figura 19).

Tabla 10: Resultados de liberación de análisis de especificación y lote para fosforilasa de timidina recombinante

Atributo	Criterios de aceptación	Resultados del análisis por lotes
Aspecto	Líquido incoloro a amarillo ligeramente claro o ligeramente nebuloso	Líquido amarillo ligeramente nebuloso
Tamaño MW	Banda principal consistente con el estándar de referencia 45 kD	45 kD
Endotoxina	Pureza \geq 95%	\geq 99%
Identidad	NMT 4.000 UE/ml	90-150 UE/ml
Célula huésped residual de ADN	Coincide con la secuencia de aminoácidos N terminal (NCBI BLAST) de MFLAQEIRK	Idéntico a NCBI BLAST (100% de alineación)
Kanamicina	NMT 10ppb	0,0002 a 0,001 ppb
Bioburden	NMT 10 CFU/ml	0 CFU/ml
Kanamicina	NMT 10ppm	0,23 ppm

Tabla 11: Características hematológicas (Media \pm SEM) de los materiales de prueba y control

Parámetro	Ratón		Perro	
	EE-TP (n=9)	Cargado (n=9)	EE-TP (n=72)	Cargado (n=54)
MCV(fl)	37,9 \pm 0,4	37,1 \pm 1,0	59,2 \pm 0,4	61,2 \pm 0,4
MCH(pg)	10,2 \pm 0,4	10,1 \pm 0,4	18,1 \pm 0,2	18,8 \pm 0,2
MCHC (g/dl)	27,2 \pm 1,0	26,8 \pm 1,2	30,6 \pm 0,2	30,9 \pm 0,2
Hb extracelular (g/l) post formulación (hora)*:	0 0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	6 0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	24 0,6 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2
Fosforilasa de timidina encapsulada (UI/ml)	123,7 \pm 8,5	NA	147,9 \pm 5,9	NA
Fosforilasa de timidina extracelular (UI/ml) post formulación (hora)*:	0 0,2 \pm 0,1	NA	0,3 \pm 0,0	NA
	6 0,3 \pm 0,1	NA	0,6 \pm 0,0	NA
	24 1,7 \pm 0,1	NA	2,4 \pm 0,1	NA
NA, No aplicable *n= 4				

Tabla 12: Parámetros de química clínica seleccionados (\pm DE Media) para ratones tratados durante 4 semanas

Parámetro/sexo	Tratamiento			
	Control dos veces semanalmente	Una vez cada dos semanas Grupo 2 (n=5)	Dos veces semanalmente Grupo 3 (n=5)	
Colesterol (mM)	Machos	2,73 \pm 0,22	3,15 \pm 0,30*	2,97 \pm 0,29
	Hembras	2,31 \pm 0,04	2,24 \pm 0,23	2,09 \pm 0,08*
Triglicerida (mM)	Machos	0,92 \pm 0,12	2,62 \pm 0,30**	1,49 \pm 0,39**
	Hembras	1,62 \pm 0,77	2,13 \pm 0,26	1,43 \pm 0,25
Urea (mM)	Machos	9,69 \pm 1,20	8,34 \pm 1,51	7,95 \pm 0,45*
	Hembras	8,36 \pm 0,82	6,84 \pm 0,58**	6,20 \pm 0,84**
Creatina (μ M)	Machos	6,0 \pm 1,5	5,0 \pm 1,6	4,0 \pm 1,9*
	Hembras	7,0 \pm 1,7	8,0 \pm 2,2	7,0 \pm 1,8
Calcio (mM)	Machos	2,21 \pm 0,06	2,14 \pm 0,11	2,36 \pm 0,15**
	Hembras	2,21 \pm 0,20	2,20 \pm 0,29	2,32 \pm 0,10
Fosfatasa alcalina (U/l)	Machos	127 \pm 11,3	131 \pm 11,2	118 \pm 25,9
	Hembras	159 \pm 10,1	153 \pm 7,8	141 \pm 17,7*
Grupos comparados usando la prueba t de student * p<0,05 (para comparaciones con Grupo 1) ** p<0,01 (para comparaciones con Grupo 1)				

Tabla 13: Parámetros de hematología seleccionados (\pm DE Media) para ratones tratados durante 4 semanas

		Tratamiento		
Parámetro/sexo	Control dos veces semanalmente Grupo 1 (n=5)	Una vez cada dos semanas Grupo 2 (n=5)	Dos veces semanalmente Grupo 3 (n=5)	
RBC ($\times 10^{12}/l$)				
Machos	10,03 \pm 0,41	9,80 \pm 0,55	9,83 \pm 0,53	
Hembras	9,79 \pm 0,29	9,72 \pm 0,73	9,22 \pm 0,32	
Hb (g/dl)				
Machos	15,2 \pm 0,66	14,7 \pm 0,99	14,9 \pm 0,79	
Hembras	15,1 \pm 0,28	15,5 \pm 0,99	14,6 \pm 0,52	
Hct (l/l)				
Machos	0,48 \pm 0,03	0,48 \pm 0,02	0,47 \pm 0,02	
Hembras	0,48 \pm 0,01	0,48 \pm 0,03	0,45 \pm 0,01*	
MCH (pg)				
Machos	15,2 \pm 0,06	15,1 \pm 0,96	15,1 \pm 0,23	
Hembras	15,4 \pm 0,36	16,0 \pm 0,17**	15,8 \pm 0,16*	
MCHC (g/dl)				
Machos	32,0 \pm 0,82	30,9 \pm 2,19	31,8 \pm 0,77	
Hembras	31,5 \pm 0,77	32,3 \pm 0,51*	32,6 \pm 0,38*	
Grupos comparados usando la prueba t de student				
10 * $p < 0,05$ (para comparaciones con Grupo 1)				
** $p < 0,01$ (para comparaciones con Grupo 1)				

Tabla 14: Parámetros de análisis de orina (\pm DE Media) para la predosis de perro y después del tratamiento durante 4 semanas

		Tratamiento		
Parámetro/sexo	Día	Control dos veces semanalmente Grupo 1 (n=3)	Una vez cada dos semanas Grupo 2 (n=3)	Dos veces semanalmente Grupo 3 (n=3)
pH				
Machos	Predosis 28	5,1 \pm 0,17	5,2 \pm 0,06	5,2 \pm 0,21
Hembras	Predosis 28	5,0 \pm 0,25	5,1 \pm 0,10	6,2 \pm 0,46
		5,3 \pm 0,12	5,3 \pm 0,12	5,3 \pm 0,06
		5,0 \pm 0,12	5,1 \pm 0,12	5,5 \pm 0,38
Gravedad específica (g/l)				
Machos	Predosis 28	1.034 \pm 7,0	1.031 \pm 4,6	1.035 \pm 3,5
Hembras	Predosis 28	1.028 \pm 12,3	1.030 \pm 2,6	1.019 \pm 4,5
		1.027 \pm 5,1	1.027 \pm 9,0	1.034 \pm 3,6
		1.025 \pm 2,3	1.029 \pm 8,1	1.025 \pm 4,6
Cloruro (mmol)				
Machos	Predosis 28	41,67 \pm 6,19	27,33 \pm 9,21	28,46 \pm 11,10
Hembras	Predosis 28	34,47 \pm 6,51	36,86 \pm 15,65	58,99 \pm 14,83
		41,07 \pm 5,48	27,37 \pm 7,59	37,95 \pm 3,34
		32,58 \pm 5,41	19,52 \pm 6,61	35,99 \pm 17,04
Sodio (mmol)				
Machos	Predosis 28	13,44 \pm 1,93	5,03 \pm 2,35	6,41 \pm 6,05
Hembras	Predosis 28	10,68 \pm 4,57	11,47 \pm 8,82	52,90 \pm 2,92
		6,28 \pm 1,52	4,93 \pm 1,97	8,38 \pm 4,78
		4,31 \pm 0,86	3,75 \pm 3,09	21,34 \pm 23,84
Potasio (mmol)				
Machos	Predosis 28	33,67 \pm 3,84	21,53 \pm 4,95	22,89 \pm 8,75
Hembras	Predosis 28	26,28 \pm 4,75	27,78 \pm 8,31	24,67 \pm 4,03
		28,35 \pm 3,71	22,04 \pm 7,01	28,96 \pm 1,66
		23,67 \pm 5,25	14,72 \pm 2,34	17,49 \pm 2,71

Tabla 15: Parámetros hematológicos seleccionados (\pm DE Media) para predosis de perros, durante y después del tratamiento durante 4 semanas

5	Parámetro/sexo	Tratamiento			
		Día	Control dos veces semanalmente Grupo 1	Una vez cada dos semanas Grupo 2	Dos veces semanalmente Grupo 3
10	RBC x10 ¹² /l)				
	Machos	Predosis	6,20 \pm 0,39	5,92 \pm 0,32	5,68 \pm 0,09
		14	5,50 \pm 0,18	5,51 \pm 0,19	4,45 \pm 0,38
		21	5,40 \pm 0,25	5,39 \pm 0,39	4,67 \pm 0,22
	Hembras	28	5,70 \pm 0,27	6,10 \pm 0,47	5,10 \pm 0,46
15		Predosis	5,85 \pm 0,36	6,04 \pm 0,17	6,19 \pm 0,66
		14	5,17 \pm 0,51	5,83 \pm 0,37	5,76 \pm 0,29
		28	5,15 \pm 0,32	6,06 \pm 0,23	5,76 \pm 0,61
20	Hb (g/dl)				
	Machos	Predosis	14,1 \pm 0,75	13,0 \pm 0,31	13,0 \pm 0,61
		14	12,8 \pm 0,26	12,4 \pm 0,25	10,8 \pm 1,10
		21	12,3 \pm 0,42	12,2 \pm 1,25	11,2 \pm 1,00
		28	12,5 \pm 0,31	13,3 \pm 1,05	11,7 \pm 1,53
	Hembras	Predosis	14,1 \pm 1,10	14,0 \pm 0,30	14,2 \pm 1,45
		14	12,2 \pm 1,39	13,5 \pm 0,95	13,0 \pm 0,35
25		28	12,2 \pm 0,62	13,3 \pm 0,50	12,6 \pm 1,48
30	Hct (l/l)				
	Machos	Predosis	0,43 \pm 0,03	0,40 \pm 0,01	0,40 \pm 0,02
		14	0,37 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,31 \pm 0,03
		21	0,38 \pm 0,02	0,37 \pm 0,04	0,34 \pm 0,03
		28	0,40 \pm 0,02	0,42 \pm 0,03	0,37 \pm 0,43
	Hembras	Predosis	0,42 \pm 0,03	0,42 \pm 0,01	0,42 \pm 0,04
		14	0,37 \pm 0,04	0,40 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01
		28	0,39 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02	0,40 \pm 0,05
35	Reticulocito (%)				
	Machos	Predosis	1,30 \pm 0,21	0,80 \pm 0,27	0,90 \pm 0,40
		14	2,00 \pm 0,20	1,00 \pm 0,22	2,80 \pm 0,51
	Hembras	21	1,80 \pm 0,22	1,30 \pm 0,28	2,80 \pm 1,14
		28	1,40 \pm 0,32	1,40 \pm 0,34	2,40 \pm 0,95
		Predosis	1,50 \pm 0,60	1,40 \pm 0,16	1,50 \pm 0,19
40		14	2,20 \pm 0,39	1,40 \pm 0,24	2,30 \pm 0,23
		28	2,00 \pm 0,26	1,60 \pm 0,56	2,80 \pm 1,39
45	Recuento de plaquetas (x 10 ⁹ /l)				
	Machos	Predosis	352 \pm 30,2	376 \pm 30,2	390 \pm 11,5
		14	353 \pm 34,4	280 \pm 34,4	122 \pm 40,1
	Hembras	21	361 \pm 27,0	207 \pm 27,0	233 \pm 14,8
		28	401 \pm 19,6	310 \pm 19,6	286 \pm 41,0
		Predosis	349 \pm 18,5	354 \pm 18,5	370 \pm 30,0
50		14	368 \pm 21,1	239 \pm 21,1	290 \pm 26,9
		28	359 \pm 31,5	300 \pm 31,5	227 \pm 115,0

55

60

65

Tabla 16: Resumen de hallazgos relacionados con el tratamiento en los pulmones de ratones después del tratamiento durante 4 semanas

Sexo/Grupo Frecuencia de dosis		Macho 1 Dos veces/se mana	Macho 2 Una vez/dos semanas	Macho 3 dos veces/se mana	Hembra 1 Dos veces/se mana	Hembra 2 Una vez/dos semanas	Hembra 3 Dos veces/se mana
Trombo/ émbolo	Mínimo	1	3	2	1	3	5
	Ligero	0	2	0	0	2	2
	Moderado	0	0	0	0	1	2
	Marcado	0	0	0	0	1	0
	Total	1	5	2	1	7	9
Células inflamatorias perivasculares	Mínimo	0	2	1	0	3	6
	Ligero	0	1	0	0	2	1
	Moderado	0	0	0	0	1	1
	Marcado	0	3	1	0	6	8
	Total	0	6	2	0	12	16
Número de animales examinados		10	9	10	10	10	10

Tabla 17: Pesos de órganos seleccionados (\pm DE Media) para perros que reciben tratamiento durante 4 semanas

Parámetro/sexo	Control dos veces semanalmente Grupo 1	Una vez cada dos semanas Grupo 2	Dos veces semanalmente Grupo 3
5			
Timo (g)			
Machos	11,91 \pm 2,67	18,43 \pm 13,40	4,12 \pm 2,56
Hembras	19,56 \pm 12,15	10,97 \pm 5,4	2,35 \pm 0,91
10			
Cerebro (g)			
Machos	83,0 \pm 5,2	82,5 \pm 2,4	94,5 \pm 2,8
Hembras	78,3 \pm 7,2	76,6 \pm 9,9	73,9 \pm 5,3
Vejiga (g/)			
Machos	365 \pm 7	415 \pm 36	471 \pm 21
Hembras	324 \pm 33	311 \pm 32	379 \pm 29
15			
Bazo (g)			
Machos	94,1 \pm 34,1	113,6 \pm 17,0	111,8 \pm 299
Hembras	74,4 \pm 19,0	62,1 \pm 5,1	98,3 \pm 33,3
Corazón (g)			
Machos	83,1 \pm 11,0	84,4 \pm 9,2	84,1 \pm 8,5
Hembras	79,1 \pm 9,1	71,5 \pm 10,5	79,5 \pm 8,1
20			
Riñones (g)			
Machos	54,3 \pm 3,6	60,6 \pm 4,4	59,1 \pm 2,5
Hembras	47,9 \pm 3,4	49,9 \pm 5,8	51,3 \pm 4,1

25 *Discusión*

30 [0192] EE-TP se formuló usando una diálisis hipoosmótica reversible, permitiendo la administración de 330 a 364 UI/kg/ocasión en el ratón y de 194 a 200 UI/kg/ocasión en el perro. La dosis clínica anticipada propuesta de fosforilasa de timidina es de 200 UI/kg/dos semanas, y así se administraron exposiciones 6,6 veces y 4 veces superiores a esta dosis respectivamente en ratones y perros que recibieron EE-TP dos veces por semana, logrando márgenes de seguridad satisfactorios para ensayos clínicos. Los datos de estabilidad demostraron que el tiempo de retraso entre la formulación de EE-TP y la infusión no tuvo ningún efecto de la actividad de fosforilasa de timidina encapsulada y, por lo tanto, la dosis administrada. La actividad de fosforilasa de timidina extracelular a las seis horas post formulación representó el 0,2% y el 0,4% de la enzima encapsulada en eritrocitos para el eritrocito de ratón y perro, respectivamente, demostrando la estabilidad del portador de eritrocitos durante el período comprendido entre la formulación de EE-TP y la infusión. En el entorno clínico, se prevé que la infusión de EE-TP tendrá lugar dentro de las 24 horas de la formulación.

40 [0193] En el estudio de 4 semanas con ratones, se registró una incidencia y gravedad aumentadas de trombos/émbolos en los pulmones en animales tratados con EE-TP, en comparación con los controles. Esto se asoció con la presencia de células inflamatorias perivasculares, que es una respuesta normal a la presencia de trombos/émbolos. Los trombos en los pulmones provocaron la muerte de un ratón tratado con una sustancia de prueba y también pueden estar relacionados con los signos clínicos observados hacia el final del período de tratamiento (apariencia no apisonada, piloerección y postura encorvada). Los estudios con ratones emplearon eritrocitos alogénicos y, como este hallazgo no se observó en los estudios con perros que utilizaron eritrocitos autólogos, este efecto puede estar relacionado con la administración intravenosa de eritrocitos extraños y/o la acción de anticuerpos sobre los eritrocitos administrados. El reclutamiento perivascular de células inflamatorias también puede ser una consecuencia de la inflamación pulmonar causada por la liberación local de fosforilasa de timidina, y explicaría la mayor incidencia y severidad de trombos y émbolos en los animales tratados con EE-TP. No hay evidencia de este efecto en los pulmones del paciente que ha recibido infusiones de desaminasa de adenosina encapsulada dos veces al mes durante un período de 16 años (Bax et al., 2007).

55 [0194] La ampliación esplénica y altos pesos de bazo observados tanto en EE-TP tratados y los ratones de control pueden reflejar una puesta en común de los eritrocitos debido a la administración a animales con un complemento completo de los eritrocitos, o alternativamente un secuestro de eritrocitos infundido por el bazo para el acondicionamiento y luego liberar de nuevo a la circulación. El bazo actúa como un reservorio de sangre y es el órgano más discriminatorio para controlar la integridad de los eritrocitos y elimina los eritrocitos senescentes o anormales de la circulación (Harris et al., 1957). La ausencia de lesiones microscópicas en el bazo indicaría que el agrandamiento del bazo no fue causado por una destrucción excesiva de eritrocitos por eritro-fagocitosis. Nuestros estudios *in vivo* de portadores de eritrocitos marcados con cromo humano (51Cr) demostraron un secuestro de entre el 51 y el 97% de las células en las primeras 144 horas de infusión, medido por conteo superficial, y esto fue seguido por una liberación casi total de las células de vuelta a la circulación, lo que sugiere que los eritrocitos fueron retenidos inicialmente por el bazo para su reparación y este mecanismo podría explicar el agrandamiento esplénico observado aquí (Bax et al., 1999).

65

[0195] Anisocitosis se observó en la mayoría de los ratones tratados y de control y esto probablemente se indujo mediante el procedimiento de diálisis, que en los resultados de eritrocitos de ratón en una reducción del volumen celular de 29 a 39%. Esto se compara con una reducción de 6 a 18% en los volúmenes de eritrocitos humanos y de perro y una posterior normalización in vivo del tamaño celular.

[0196] La administración de EE-TP a ratones una vez cada dos semanas o dos veces a la semana dio como resultado una respuesta de anticuerpos, con una mayor incidencia de anticuerpos anti-fosforilasa de timidina observados en el grupo tratado una vez cada 2 semanas. Estos resultados son consistentes con nuestros estudios previos en el ratón BALB/c donde se demostró que la administración de eritrocitos cargados con antígeno provoca respuestas inmunes humorales (Murray et al., 2006). La fuente de fosforilasa de timidina empleada en estos estudios actuales fue una proteína recombinante de *E. coli* que comparte una homología de secuencia de aminoácidos del 40% con la secuencia humana (Barton et al., 1992). Aunque se predeciría que la encapsulación dentro de los eritrocitos reduciría la inmunogenicidad de la enzima nativa, es probable que una liberación intravascular de fosforilasa de timidina de eritrocitos dañados o frágiles provoque una reacción inmunogénica. Esto es de gran interés con respecto a la aplicación clínica de EE-TP; a pesar de elevar una respuesta de anticuerpos anti-fosforilasa de timidina, el transportador de eritrocitos puede proteger simultáneamente la fosforilasa de timidina encapsulada de los anticuerpos circulantes. En el entorno clínico, se ha informado que las reacciones inmunogénicas se producen con la mayoría de las proteínas terapéuticas, con una incidencia que varía entre menos del 10% de los pacientes, hasta casi el 100% (Schellekens, 2004). El control de las respuestas de los anticuerpos durante las pruebas de seguridad preclínica y clínica de las proteínas terapéuticas y, en algunos casos, después de la aprobación de la comercialización es, por lo tanto, un tema importante.

[0197] En el perro, aunque el tratamiento dos veces por semana se toleró durante 4 semanas, el nivel observado de signos clínicos durante o poco después de la dosis desde el día 11 en adelante fue significativo, y aumentó con cada ocasión de dosificación posterior. En el contexto clínico, las náuseas y el eritema de la cara, el cuello y el brazo proximal a la infusión se han observado previamente en pacientes que reciben EE-TP con uso compasivo, y se evitaron con éxito utilizando antihistamina, medicamentos corticosteroides antiinflamatorios y anti-eméticos antes del tratamiento. Este enfoque se llevó a cabo para perros que recibían tratamientos dos veces por semana desde el día 18 en adelante para la mayoría de los animales. Como resultado de estos medicamentos previos a la dosis, la incidencia y el grado de los signos clínicos se redujeron inicialmente notablemente, sin embargo, con cada administración posterior, los signos aumentaron nuevamente. Los perros tratados cada dos semanas mostraron un patrón similar de signos clínicos en la segunda y tercera administración (Día 15 y 29). La aparición retardada de estos signos clínicos, su naturaleza transitoria asociada con la dosificación y su posterior tratamiento exitoso con fármacos antiinflamatorios, sugirieron una respuesta inmune a la administración de EE-TP. Al no haber hallazgos similares dentro de los perros de control, se concluyó que la fosforilasa de timidina era responsable.

[0198] Se detectaron anticuerpos no específicos al final del estudio en todos los perros que recibieron EE-TP y los anticuerpos anti-fosforilasa de timidina específicos se detectaron en sólo dos perros. Por lo tanto, parece que los signos clínicos se asociaron con anticuerpos no específicos o con una respuesta inmune basada en células, y no con una respuesta específica de anti-timidina fosfolasa. La preparación de fosforilasa de timidina contenía niveles bajos de endotoxinas relacionadas con el proceso, y aunque la mayoría de estos se habría eliminado por el proceso de diálisis empleado en la formulación de EE-TP, existe la posibilidad de que la formación de anticuerpos no específicos fuera causada por la presencia de endotoxinas residuales.

[0199] La Administración de Alimentos y Medicamentos (EE.UU.) recomienda un límite máximo de endotoxinas de 5 UE/kg de peso corporal para las drogas administradas por los padres; los niveles de endotoxinas en la preparación de fosforilasa de timidina antes de la formulación EE-TP estaban muy por debajo de este límite (Brito y Singh, 2011). La ausencia de anticuerpos específicos anti-fosforilasa de timidina en la mayoría de los perros sugeriría que la eliminación de EE-TP de la circulación y catabolismo posterior por enzimas lisosómicas (la ruta normal para la degradación de eritrocitos senescentes) no conduce a la presentación del antígeno, a diferencia del ratón (Murray et al., 2006). También indica que hubo una hemólisis intravascular mínima de los eritrocitos cargados con enzimas, que si se hubiera producido probablemente habría resultado en la producción de anticuerpos específicos contra la fosforilasa de timidina liberada.

[0200] Investigaciones de hematología realizadas durante y al final del periodo de tratamiento reveló en todos los grupos de perros una anemia de tipo hemorrágico aparente (reducciones en el hematocrito, concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos), con un posterior aumento de reticulocitos. Es muy probable que este cambio se deba al procedimiento de diálisis hipoosmótica utilizado para preparar los eritrocitos cargados con simultánea y fosforilasa de timidina; hay una pérdida de células de aproximadamente 38% durante el proceso y una reducción en la concentración de hemoglobina celular. Esto explicaría por qué los perros tratados una vez cada dos semanas fueron menos afectados que los tratados dos veces por semana. Los resultados de la hematología desde el final del periodo de tratamiento indicaron que, aunque estos cambios todavía estaban presentes, los parámetros volvían a los niveles normales. El aumento en los números de reticulocitos demostró que la médula ósea estaba respondiendo a la anemia y, por esta razón, estos cambios se consideran no adversos. Las encías pálidas observadas durante el tratamiento de los animales pueden ser el resultado de estos cambios hematológicos. La magnitud en la reducción del recuento de plaquetas observada en los perros tratados con EE-TP pareció ser menor

al final del período de tratamiento, lo que también sugiere una respuesta adaptativa y, por esta razón, estos cambios no se consideran adversos.

[0201] Los cambios microscópicos relacionados con el artículo de prueba se consideraron levemente a marcadamente atróficos en el timo de los perros que recibieron EE-TP cada dos semanas (Grupo 3). Este hallazgo se correlacionó con el pequeño tamaño del timo observado durante el examen macroscópico y los cambios de peso en las hembras. Se sabe que el timo es sensible a la atrofia aguda inducida por el estrés y estos cambios probablemente estén relacionados con el estrés producido por la reacción clínica, que a su vez puede ser la causa de la menor ganancia de peso corporal de este grupo (Pearse, 2006).

Referencias

[0202]

Aksoy F, Demirel G, Bilgic T, Gungor IG, Ozcelik A. A previously diagnosed mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy patient presenting with perforated ileal diverticulitis. *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2005; 16: 228-231.

Altschul S. A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. *J. Mol. Evol.* 1993; 36: 290-300.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215: 403-410.

Angervall, L., y Carlstrom, E. Theoretical criteria for the use of relative organ weights and similar ratios in biology. *1. Theoret Biol.* 1963; 4; 254-259.

Baris Z, Eminoglu T, Dalgic B, Turner L, Hasanoglu A. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): case report with a new mutation. *European Journal of Pediatrics*. 2010; 169:1375-1378.

Bartlett, MS. Properties of sufficiency and statistical tests. *P. Roy. Soc. Lond. A Mat.* 1937: 160; 268-282.

Barton GJ, Ponting CP, Spraggon G, Finnis C, y Sleep D. Human platelet-derived endothelial cell growth factor is homologous to *Escherichia coli* thymidine phosphorylase. *Protein Science*. 1992; 1: 688-690.

Bax BE, Bain MD, Talbot PJ, Parker-Williams EJ y Chalmers RA. In vivo survival of human carrier erythrocytes. *Clinical Science*. 1999; 1096: 171-178.

Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, Webster ADB y Chalmers RA. In vitro and in vivo studies of human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase. *British Journal of Haematology*. 2000; 109: 549 -554.

Bax BE, Bain MD, Fairbanks LD, Webster ADB, Ind PW, Hershfield MS y Chalmers RA. A nine year evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase therapy in a patient with adult-type adenosine deaminase deficiency. *European Journal of Haematology*. 2007; 79: 338-348.

Brito, LA, y Singh, M. Acceptable Levels of Endotoxin in Vaccine Formulations During Preclinical Research *J. Pharm. Sci.* 2011; 100; 34-37.

Cardaioli E, Da Pozzo P, Malfatti E, Battisti C, Gallus GN, Gaudiano C, Macucci M, Malandrini A, Margollicci M, Rubegni A, Dotti MT, Federico A. A second MNGIE patient without typical mitochondrial skeletal muscle involvement. *Neurological Sciences*. 2010; 31: 491-494.

Celebi N, Sahin A, Canbay O, Uzumcugil F, Aypar U. Abdominal pain related to mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome may benefit from splanchnic nerve blockade. *Paediatric Anaesthesia*. 2006; 16: 1073-1076.

Chalmers R. Comparison and potential of hypo-osmotic and iso-osmotic erythrocyte ghosts and carrier erythrocytes as drug and enzyme carriers. *Bibl. Haematol.* 1985; 51; 15-24. Chinnery PF and Turnbull DM. Epidemiology and Treatment of Mitochondrial Disorders. *American Journal of Medical Genetics* 2001; 106: 94 - 101.

Devereux J, Haerberli P y Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research*. 1984; 12: 387-395 Eccleston PA, Funa K and Heldin C-H. Neurons of the peripheral nervous system express thymidine phosphorylase. *Neuroscience Letters*. 1995; 192: 137-141.

EC Commission Directive 2004/110/EC of 11 February 2004 (Official Journal No L 50/44).

5 EMEA, 2006. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). The Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins. (Effective April 2008), EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006). Available from: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf (Accessed May 11 2012).

10 FDA, 2001. Centre for Drug Evaluation and Research. Centre for Veterinary Medicine. Guidance for Industry: Bio-analytical Methods Validation. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>. (Accessed May 11, 2012).

15 FDA, 2009. Centre for Drug Evaluation and Research. Centre for Biologics Evaluation and Research. Draft Guidance for Industry: Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM192750.pdf> (Accessed May 11 2012).

20 Fisher RA. Statistical Methods for Research Workers, 14th edn., p.96. Hafner Publishing Company, New York, USA (1973).

Giordano C, Sebastiani M, De Giorgio R, Travaglini C, Tancredi A, Valentino ML, Bellan M, Cossarizza A, Hirano M, d'Amati G, Carelli V. Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion. *American Journal of Pathology*. 2008; 173: 1120-1128.

25 Halter J, Schupbach WM, Casali C, Elhasid R, Fay K, Hammans S, Illa I, Kappeler L, Krahenbuhl S, Lehmann T, Mandel H, Marti R, Mattle H, Orchard K, Savage D, Sue CM, Valcarcel D, Gratwohl A, Hirano M. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplantation*, 2010; 1-8.

30 Harris, IM, McAlister, JM y Prankerd, TAJ. The relationship of abnormal red cells to the normal spleen. *Clin. Sci*. 1957; 16; 233-230.

35 Hirano-M, Silvestri G, Blake DM, Lombes A, Minetti C, Bonilla E, Hays AP, Lovelace RE, Butler I, Bertorini TE, Threlkeld AB, Mitumoto H, Salberg LM, Rowland LP, y DiMauro S. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of a autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology*. 1994; 44: 721-727.0

40 Hirano M, Nishigaki Y, y Marti R. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE): A disease of two genomes. *The Neurologist*. 2004; 10: 8-17.

45 Hirano M, Marti R, Casali C, Tadesse S, Uldrick T, Fine B, Escolar DM, Valentino ML, Nishino I, Hesdorffer C, Schwartz J, Hawks RG, Martone DL, Cairo MS, DiMauro S, Stanzani M, Garvin JH y Savage DG. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology*. 2006; 67: 1458-1460.

Hirano M, Casali C, Tadesse S, Stanzani M y Savage DG. Sustained biochemical and clinical improvements two years post-allogeneic stem cell transplantation in a patient with MNGIE. *American Academy of Neurology Annual Meeting Abstract S48.002*. 2008.

50 Ihler, G.M., Glew, R.H. y Schnure, F.W. Enzyme loading of erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973;70:2663-2666.

55 la Marca G, Malvagia S, Casetta B, Pasquini EI, Pela L, Hirano M, Donati MA y Zammarchi E. Pre- and post-dialysis quantitative dosage of thymidine in urine and plasma of a MNGIE patient by using HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*. 2006; 41: 586-592.

Lara MC, Weiss B, Illa I, Madoz P, Massuet L, Andreu AL, Valentino ML, Anikster Y, Hirano M y Marti R. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology*. 2006; 67: 1461-1463.

60 Marti R, Nishigaki Y, y Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 303: 14-18.

65 Marti R, Spinazzola A, Tadesse S, Nishino I, Nishigaki Y, y Hirano M. Definitive Diagnosis of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy by Biochemical Assays. *Clinical Chemistry*. 2004; 50: 120-124.

- Matsukawa K, Moriyama A, Kawai Y, Asai K, y Kato T. Tissue distribution of human gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its drug-induced expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996; 1314: 71-82.
- 5 Miller K, Bowsher R, Celniker A, Gibbons J, Gupta S, Lee J, Swanson S, Smith W, Weiner R, Workshop on bioanalytical methods validation for macromolecules: summary report, *Pharm. Res.* 2001; 18: 1373-1383.
- Mire-Sluis A, Barrett Y, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, Parish T, Scott G, Shankar G, Shores E, Swanson S, Taniguchi G, Wierda D, Zuckerman L. Recommendations for the design and optimization of
10 immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products, *J. Immunol. Meth.* 2004; 289; 1-16.
- Moran NF, Bain MD, Muqit M y Bax BE. Carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy in MNGIE. *Neurology*. 2008; 71: 686-688.
- 15 Murray, AM, Pearson, IFS, Chalmers RA, Bain, MD. y Bax, BE. The mouse immune response to carrier erythrocyte entrapped antigens. *Vaccine*. 2006; 24; 61296139.
- Nishigaki Y, Marti R, Copeland WC, y Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111: 1913-1921.
- 20 Nishigaki Y, Marti R, y Hirano M. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Human Molecular Genetics*. 2004; 13: 91-101.
- Nishino I, Spinazzola A, y Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*. 1999; 283: 689-692.
- 25 Nishino I, Spinazzola A, Papadimitriou A, Hammans S, Steiner I, Hahn C.D, Connolly AM, Verloes A, Guimaraes J, Maillard I, Hamano H, Donati MA, Semrad CE, Russell JA, Andreu AL, Hadjigeorgiou GM, Vu TH, Tadesse S, Nygaard TG, Nonaka I, Hirano I, Bonilla E, Rowland LP, DiMauro S, y Hirano M. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Annals of Neurology*. 2000; 47: 792-800.
- 30 Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscular Disorders*. 2001; 11: 7-10.
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM (98) 17.
- 35 Papadimitriou A, Comi GP, Hadjigeorgiou GM, Bordoni A, Sciacco M, Napoli L, Prella A, Moggio M, Fagiolari G, Bresolin N, Salani S, Anastasopoulos I, Giassakis G, Divari R, y Scarlato G. Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology*. 1998; 51: 1086-1092.
- Pearse G. *Toxicol Pathol*. 2006; 34: 515-547
- 45 Said G, Lacroix C, Plante-Bordeneuve V, Messing B, Slama A, Crenn P, Nivelon-Chevallier A, Bedenne L, Soichot P, Manceau E, Rigaud D, Guiochon-Mantel A, Matuchansky C. Clinicopathological aspects of the neuropathy of neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) in four patients including two with a Charcot-Marie-Tooth pres- entation. *Journal of Neurology*. 2005; 252: 655-662.
- 50 Schellekens, H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin. Ther.* 2002; 24; 1720-1740.
- Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett Y, Bowsher R, Finco-Kent D, Fiscella M, Gorovits B, Kirschner S, Moxness M, Parish T, Quarby V, Smith H, Smith W, Zuckerman L, Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. 1. *Phann. Biomed. Anal.* 2008; 48; 1267-1281.
- 55 Shoffner IM. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Disease. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2005 (updated 2010).
- 60 Spinazzola.A, Marti R, Nishino I, Andreu A L, Naini A, Tadesse S, Pela I, Zammarchi E, Donati M A, Oliver J A, y Hirano,M. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 4128-4133.

Sprandel U, Clark JB, Hubbard AR, Chalmers RA. Morphology of hemoglobin containing human erythrocytes "ghosts". *Micron*. 1981; 12: 29-36.

5 The Human Gene Mutation Database (HGMD) at the Institute of Medical Genetics in Cardiff <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> (Web page accessed 08/10/2010).

The UK Good Laboratory Practice Regulations (Statutory Instrument 1999 No. 3106, as amended by Statutory Instrument 2004 No. 994).

10 Usuki K, Norberg L, Larsson E, Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Rubin K, y Heldin C-H. Localization of platelet-derived endothelial cell growth factor in human placenta and purification of an alternatively processed form. *Cell Regulation*. 1990; 1: 577-584.

15 Valentino M, Marti R, Tadesse S, López L, Manes J, Lyzak J, Hahn A, Carelli V, and Hirano M. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Letters*. 2007; 581:3410-3414.

Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biom. Bull*. 1945: 1; 80-83

20 LISTADO DE SECUENCIAS

[0203]

25 <110> ST GEORGE'S HOSPITAL MEDICAL SCHOOL

<120> TRATAMIENTO PARA LA ENCEFALOMIOPATÍA NEUROGASTROINTESTINAL MITOCONDRIAL (MNGIE)

30 <130> N.114006A

<150> GB 1116767.3

<151> 2011-09-28

35 <160> 1

<170> Patente versión 3,5

<210> 1

<211> 440

<212> PRT

40 <213> Escherichia coli

<400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 672 295 T3

5

10

Met Phe Leu Ala Gln Glu Ile Ile Arg Lys Lys Arg Asp Gly His Ala
1 5 10 15

15

Leu Ser Asp Glu Glu Ile Arg Phe Phe Ile Asn Gly Ile Arg Asp Asn
20 25 30

20

Thr Ile Ser Glu Gly Gln Ile Ala Ala Leu Ala Met Thr Ile Phe Phe
35 40 45

25

His Asp Met Thr Met Pro Glu Arg Val Ser Leu Thr Met Ala Met Arg
50 55 60

30

Asp Ser Gly Thr Val Leu Asp Trp Lys Ser Leu His Leu Asn Gly Pro
65 70 75 80

35

Ile Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Val Thr Ser Leu
85 90 95

40

Met Leu Gly Pro Met Val Ala Ala Cys Gly Gly Tyr Ile Pro Met Ile
100 105 110

45

Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
115 120 125

50

Ser Ile Pro Gly Phe Asp Ile Phe Pro Asp Asp Asn Arg Phe Arg Glu
130 135 140

55

Ile Ile Lys Asp Val Gly Val Ala Ile Ile Gly Gln Thr Ser Ser Leu
145 150 155 160

60

65

ES 2 672 295 T3

5 Ala Pro Ala Asp Lys Arg Phe Tyr Ala Thr Arg Asp Ile Thr Ala Thr
165 170 175

10 Val Asp Ser Ile Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ala Lys Lys Leu
180 185 190

15 Ala Glu Gly Leu Asp Ala Leu Val Met Asp Val Lys Val Gly Ser Gly
195 200 205

20 Ala Phe Met Pro Thr Tyr Glu Leu Ser Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ile
210 215 220

25 Val Gly Val Ala Asn Gly Ala Gly Val Arg Thr Thr Ala Leu Leu Thr
225 230 235 240

30 Asp Met Asn Gln Val Leu Ala Ser Ser Ala Gly Asn Ala Val Glu Val
245 250 255

35 Arg Glu Ala Val Gln Phe Leu Thr Gly Glu Tyr Arg Asn Pro Arg Leu
260 265 270

40 Phe Asp Val Thr Met Ala Leu Cys Val Glu Met Leu Ile Ser Gly Lys
275 280 285

45 Leu Ala Lys Asp Asp Ala Glu Ala Arg Ala Lys Leu Gln Ala Val Leu
290 295 300

50 Asp Asn Gly Lys Ala Ala Glu Val Phe Gly Arg Met Val Ala Ala Gln
305 310 315 320

55 Lys Gly Pro Thr Asp Phe Val Glu Asn Tyr Ala Lys Tyr Leu Pro Thr
325 330 335

60 Ala Met Leu Thr Lys Ala Val Tyr Ala Asp Thr Glu Gly Phe Val Ser
340 345 350

65 Glu Met Asp Thr Arg Ala Leu Gly Met Ala Val Val Ala Met Gly Gly
355 360 365

70 Gly Arg Arg Gln Ala Ser Asp Thr Ile Asp Tyr Ser Val Gly Phe Thr
370 375 380

75 Asp Met Ala Arg Leu Gly Asp Gln Val Asp Gly Gln Arg Pro Leu Ala
385 390 395 400

80 Val Ile His Ala Lys Asp Glu Asn Asn Trp Gln Glu Ala Ala Lys Ala
405 410 415

5 Val Lys Ala Ala Ile Lys Leu Ala Asp Lys Ala Pro Glu Ser Thr Pro
420 425 430

10 Thr Val Tyr Arg Arg Ile Ser Glu
435 440

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 [0204]
<110> ST GEORGE'S HOSPITAL MEDICAL SCHOOL
20 <120> TRATAMIENTO PARA LA ENCEFALOMIOPATÍA NEUROGASTROINTESTINAL MITOCONDRIAL (MNGIE)
<130> N.114006A
<150> GB 1116767.3
25 <151> 2011-09-28
<160> 1
<170> PatentIn versión 3,5
30 <210> 1
<211> 440
<212> PRT
<213> Escherichia coli
35 <400> 1

40

45

50

55

60

65

ES 2 672 295 T3

5 Met Phe Leu Ala Gln Glu Ile Ile Arg Lys Lys Arg Asp Gly His Ala
1 5 10

10 Leu Ser Asp Glu Glu Ile Arg Phe Phe Ile Asn Gly Ile Arg Asp Asn
20 25 30

15 Thr Ile Ser Glu Gly Gln Ile Ala Ala Leu Ala Met Thr Ile Phe Phe
35 40 45

20 His Asp Met Thr Met Pro Glu Arg Val Ser Leu Thr Met Ala Met Arg
50 55 60

25 Asp Ser Gly Thr Val Leu Asp Trp Lys Ser Leu His Leu Asn Gly Pro
65 70 75 80

30 Ile Val Asp Lys His Ser Thr Gly Gly Val Gly Asp Val Thr Ser Leu
85 90 95

35 Met Leu Gly Pro Met Val Ala Ala Cys Gly Gly Tyr Ile Pro Met Ile
100 105 110

40 Ser Gly Arg Gly Leu Gly His Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu
115 120 125

45 Ser Ile Pro Gly Phe Asp Ile Phe Pro Asp Asp Asn Arg Phe Arg Glu
130 135 140

50 Ile Ile Lys Asp Val Gly Val Ala Ile Ile Gly Gln Thr Ser Ser Leu
145 150 155 160

55

60

65

ES 2 672 295 T3

5 Ala Pro Ala Asp Lys Arg Phe Tyr Ala Thr Arg Asp Ile Thr Ala Thr
165 170 175

10 Val Asp Ser Ile Pro Leu Ile Thr Ala Ser Ile Leu Ala Lys Lys Leu
180 185 190

15 Ala Glu Gly Leu Asp Ala Leu Val Met Asp Val Lys Val Gly Ser Gly
195 200 205

20 Ala Phe Met Pro Thr Tyr Glu Leu Ser Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ile
210 215 220

25 Val Gly Val Ala Asn Gly Ala Gly Val Arg Thr Thr Ala Leu Leu Thr
225 230 235 240

30 Asp Met Asn Gln Val Leu Ala Ser Ser Ala Gly Asn Ala Val Glu Val
245 250 255

35 Arg Glu Ala Val Gln Phe Leu Thr Gly Glu Tyr Arg Asn Pro Arg Leu
260 265 270

40 Phe Asp Val Thr Met Ala Leu Cys Val Glu Met Leu Ile Ser Gly Lys
275 280 285

45 Leu Ala Lys Asp Asp Ala Glu Ala Arg Ala Lys Leu Gln Ala Val Leu
290 295 300

50 Asp Asn Gly Lys Ala Ala Glu Val Phe Gly Arg Met Val Ala Ala Gln
305 310 315 320

55 Lys Gly Pro Thr Asp Phe Val Glu Asn Tyr Ala Lys Tyr Leu Pro Thr
325 330 335

60 Ala Met Leu Thr Lys Ala Val Tyr Ala Asp Thr Glu Gly Phe Val Ser
340 345 350

65 Glu Met Asp Thr Arg Ala Leu Gly Met Ala Val Val Ala Met Gly Gly
355 360 365

70 Gly Arg Arg Gln Ala Ser Asp Thr Ile Asp Tyr Ser Val Gly Phe Thr
370 375 380

75 Asp Met Ala Arg Leu Gly Asp Gln Val Asp Gly Gln Arg Pro Leu Ala
385 390 395 400

80 Val Ile His Ala Lys Asp Glu Asn Asn Trp Gln Glu Ala Ala Lys Ala
405 410 415

ES 2 672 295 T3

5 Val Lys Ala Ala Ile Lys Leu Ala Asp Lys Ala Pro Glu Ser Thr Pro
420 425 430

10 Thr Val Tyr Arg Arg Ile Ser Glu
435 440

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Composición autóloga de eritrocitos en la que se obtienen eritrocitos de un paciente, los eritrocitos que contienen fosforilasa de timidina y que están libres de albúmina de suero bovino (BSA), en donde los eritrocitos autólogos se obtienen cargando los eritrocitos con una composición que comprende menos de 200 EU de endotoxina por mg de fosforilasa de timidina, para uso en el tratamiento de la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) en el paciente.
- 10 **2.** Los eritrocitos autólogos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fosforilasa de timidina es una fosforilasa de timidina bacteriana; preferiblemente en donde la fosforilasa de timidina bacteriana es una fosforilasa de timidina de *E. coli*; más preferiblemente en donde la fosforilasa de timidina comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma que es al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que retiene la capacidad de fosforilar la timidina.
- 15 **3.** Los eritrocitos autólogos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fosforilasa de timidina se administra al paciente en una dosis de 5 a 1.000 UI/kg, 30 a 300 UI/kg, 50 a 200 UI/kg o 75 a 150 UI/kg, y/o en donde el número de eritrocitos autólogos administrados al paciente es de 10×10^{10} a 300×10^{10} , de 75×10^{10} a 150×10^{10} , o de 100×10^{10} a 150×10^{10} .
- 20 **4.** Los eritrocitos autólogos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que los eritrocitos autólogos se administran al paciente:
- 25 (a) al menos una vez al mes;
(b) al menos una vez cada dos semanas; o
(c) al menos una vez a la semana.
- 30 **5.** Los eritrocitos autólogos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fosforilasa de timidina se administra al paciente a una dosis de 200 UI/kg una vez cada dos semanas, y/o en donde el paciente se trata durante un período de tiempo de al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o durante toda la vida del paciente, y/o
- 35 en donde la concentración de timidina o desoxiuridina en el plasma sanguíneo del paciente se reduce al 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos, 2% o menos o 0% de la concentración previa al tratamiento a tiempo de 3 a 12 meses, opcionalmente de 6 a 10 meses, después del inicio del tratamiento, y/o
- 40 en donde la concentración de timidina o desoxiuridina en la orina del paciente se reduce a menos del 70%, menos del 50%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 2% o 0% de la concentración de pretratamiento en un punto de tiempo de 3 a 12 meses, opcionalmente 6 a 10 meses, después del comienzo del tratamiento.
- 45 **6.** Los eritrocitos autólogos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en los que los eritrocitos autólogos que contienen fosforilasa de timidina se preparan cargando eritrocitos obtenidos de un paciente con fosforilasa de timidina; preferiblemente, en donde los eritrocitos se obtienen del paciente en un lugar, se envían a una instalación de procesamiento central en otro lugar, se cargan con la fosforilasa de timidina en la instalación de procesamiento central y se envían de regreso al primer lugar.
- 50 **7.** Una composición que comprende: eritrocitos que contienen fosforilasa de timidina y que están libres de albúmina de suero bovino (BSA), en donde los eritrocitos autólogos se pueden obtener cargando los eritrocitos con una composición que comprende menos de 200 UE de endotoxina por mg de fosforilasa de timidina.
- 55 **8.** La composición según la reivindicación 7, en la que la fosforilasa de timidina es una fosforilasa de timidina bacteriana; preferiblemente en donde la fosforilasa de timidina es una fosforilasa de timidina de *E. coli*; más preferiblemente en donde la fosforilasa de timidina comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma que es al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que retiene la capacidad de fosforilar timidina, y/o
- 60 donde la cantidad de fosforilasa de timidina en los eritrocitos es de 350 UI a 70,000 UI, y/o en donde el número de eritrocitos en la composición es de 10×10^{10} a 300×10^{10} , preferiblemente de 75×10^{10} a 150×10^{10} , y más preferiblemente desde 200×10^{10} hasta 150×10^{10} .
- 65 **9.** Eritrocitos autólogos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fosforilasa de timidina está libre de albúmina de suero bovino, obtenible por las etapas de:
- liberar la fosforilasa de timidina de las células bacterianas al poner en contacto las células con una enzima que

daña la pared celular y que está libre de albúmina de suero bovino, opcionalmente lisozima, y eliminar la endotoxina de la fosforilasa de timidina tal como se extrae de las células mediante:

- 5 (a) tratamiento del extracto de fosforilasa de timidina con un detergente,
(b) formación de una fase rica en detergente y una fase rica en agua donde la endotoxina se reparte en la fase rica en detergente, y
(c) eliminar y descartar la fase rica en detergente;

10 en donde las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo opcionalmente dos o más veces.

10 **10.** Los eritrocitos autólogos deben usarse de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el detergente es un detergente no iónico, preferiblemente un detergente que comprende un óxido de polietileno hidrófilo (PEG) y un grupo de hidrocarburo hidrófobo, más preferiblemente 1,1,3,3-tetrametilbutilo)fenilo-polietilenglicol (Triton X-100).

15 **11.** Eritrocitos autólogos para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde el método para preparar la fosforilasa de timidina comprende además purificar la fosforilasa de timidina mediante cromatografía de intercambio iónico.

20 **12.** Los eritrocitos autólogos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde el método de preparación de la fosforilasa de timidina comprende además digerir ácido nucleico con ADNasa o ARNasa.

25 **13.** Método in vitro para preparar eritrocitos autólogos que contienen fosforilasa de timidina que está libre de albúmina de suero bovino (BSA), cuyo método comprende:

- 25 (a) someter a diálisis hipoosmótica una suspensión de eritrocitos obtenida de un paciente en una solución que contiene fosforilasa de timidina libre de BSA obtenida por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, comprendiendo la solución además menos de 200 UE de endotoxina por mg de
30 fosforilasa de timidina, en donde la diálisis hace que se formen poros en los eritrocitos y fosforilasa de timidina para entrar en los eritrocitos;
(b) resellar los eritrocitos exponiéndolos a una solución isoosmótica.

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1

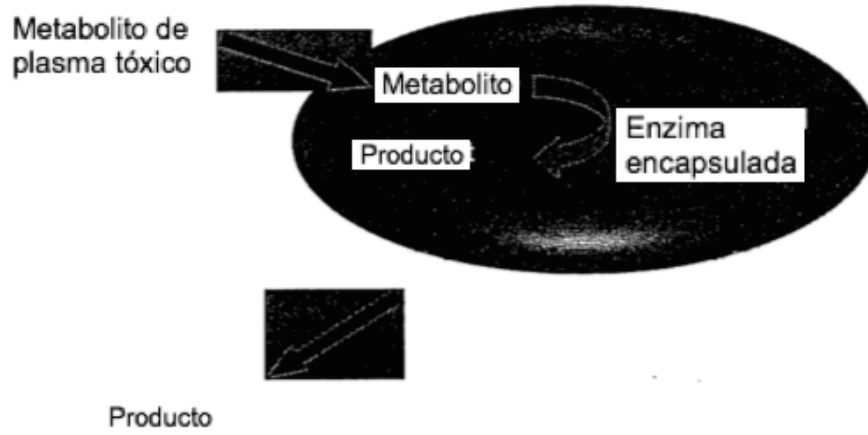


Fig. 2

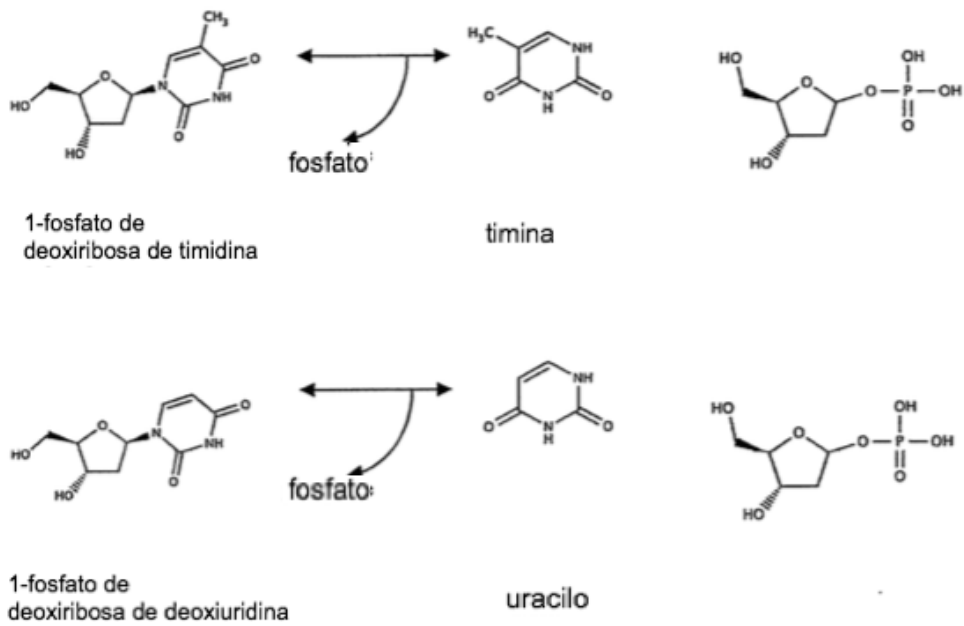


Fig. 3

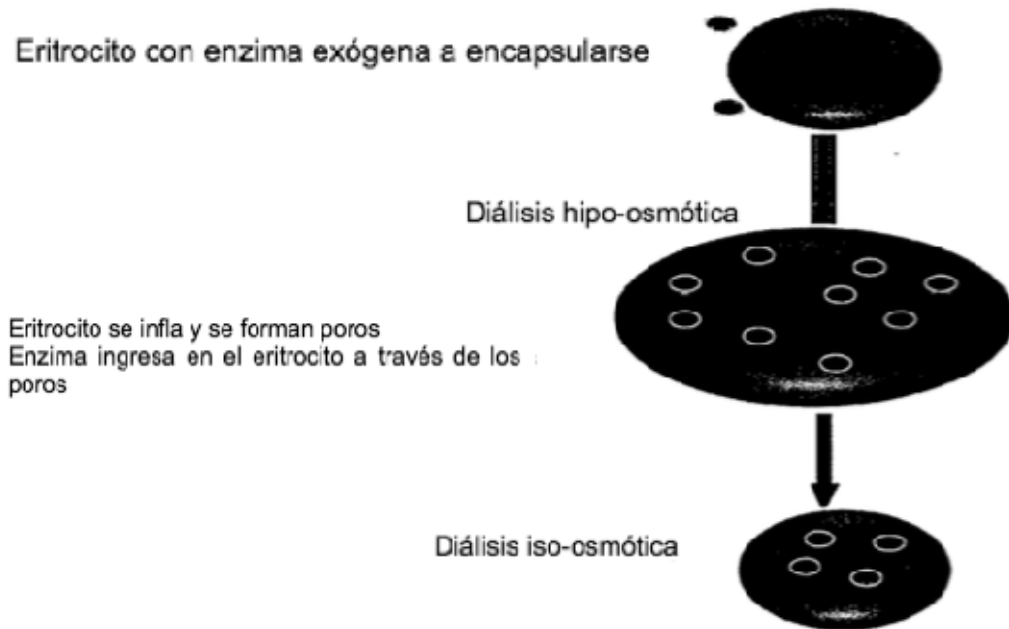


Fig. 4

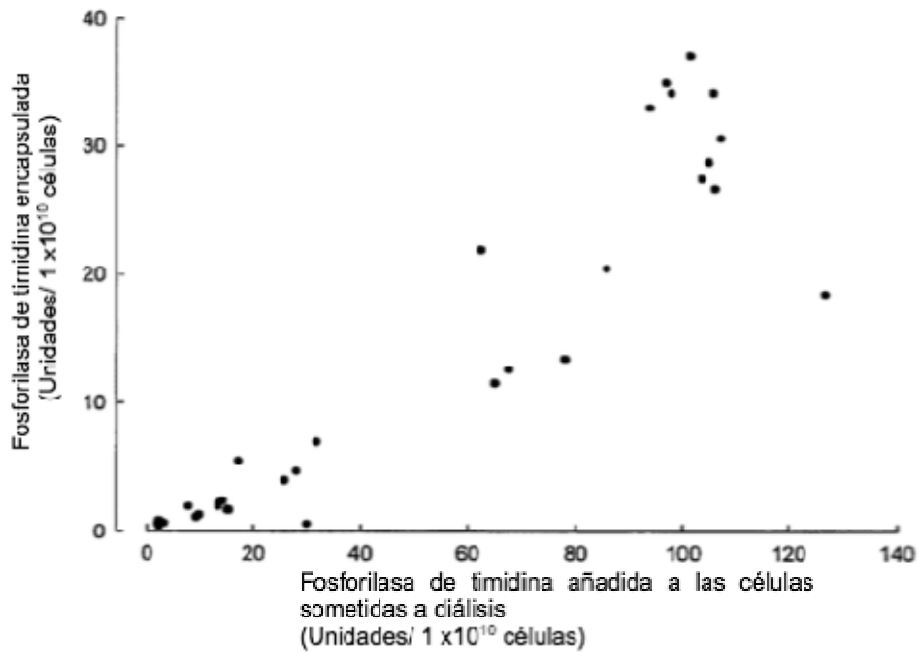


Fig. 5

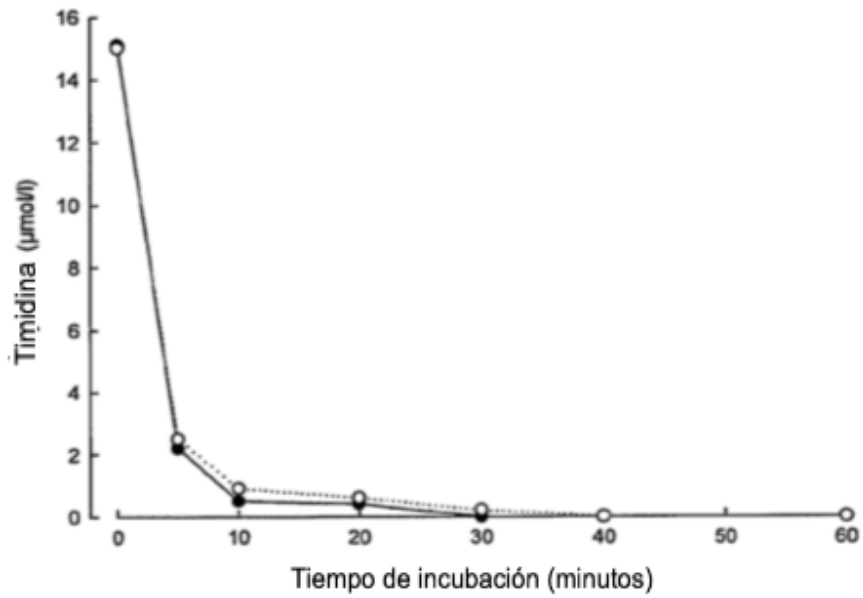


Fig. 6

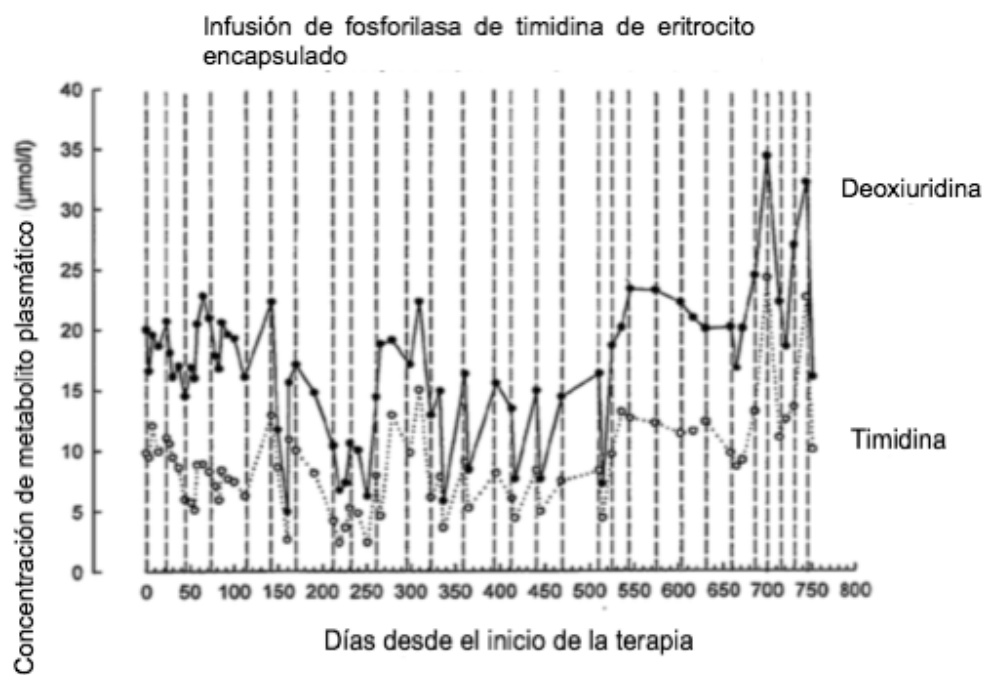


Fig. 7

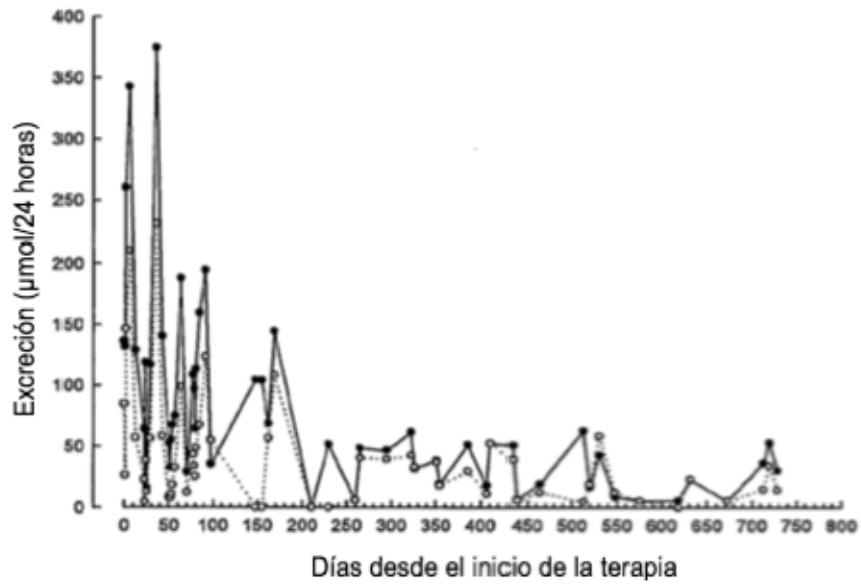


Fig. 8

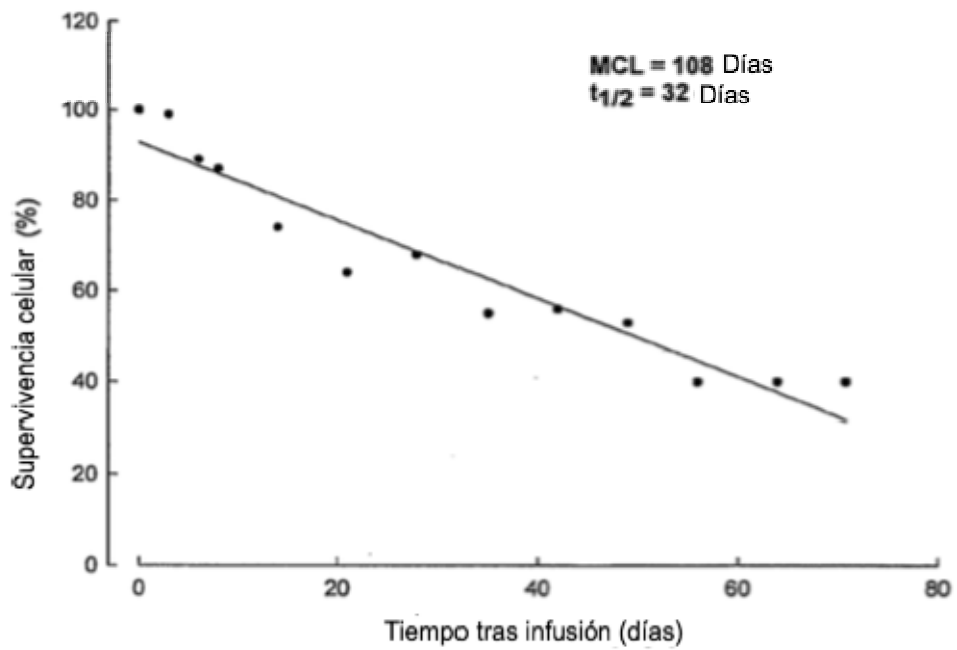


Fig. 9

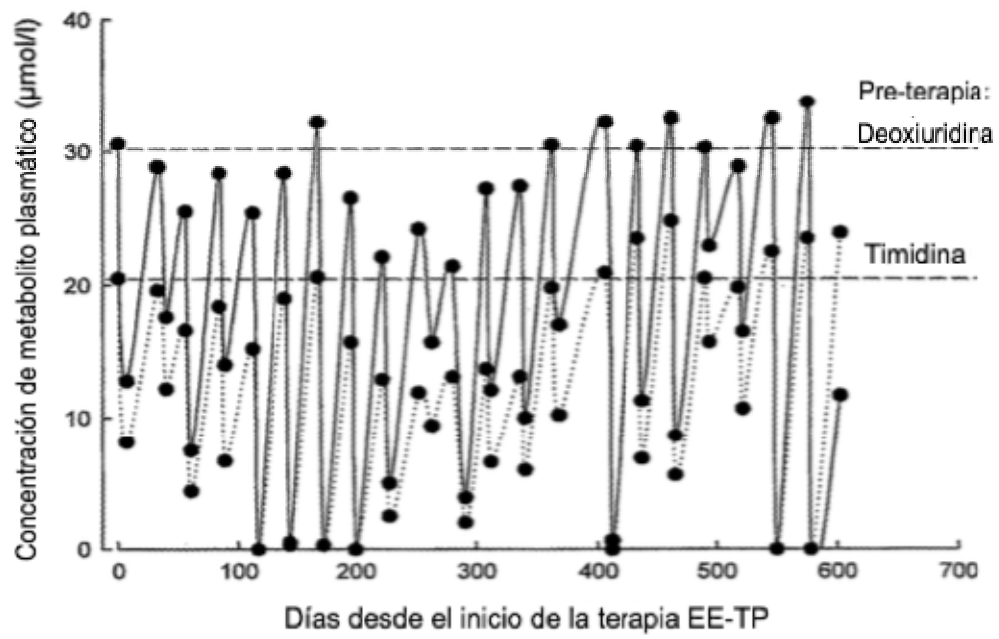


Fig. 10

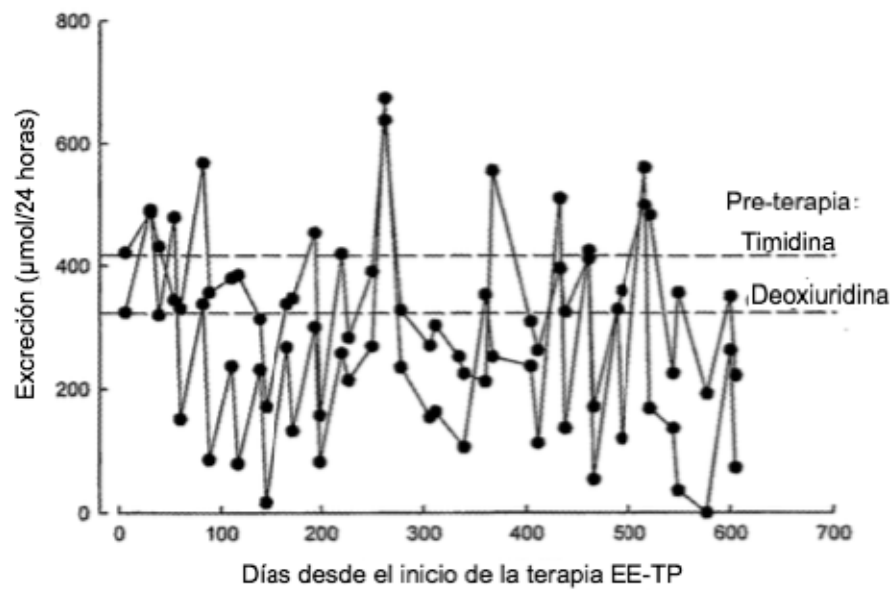


Fig.11

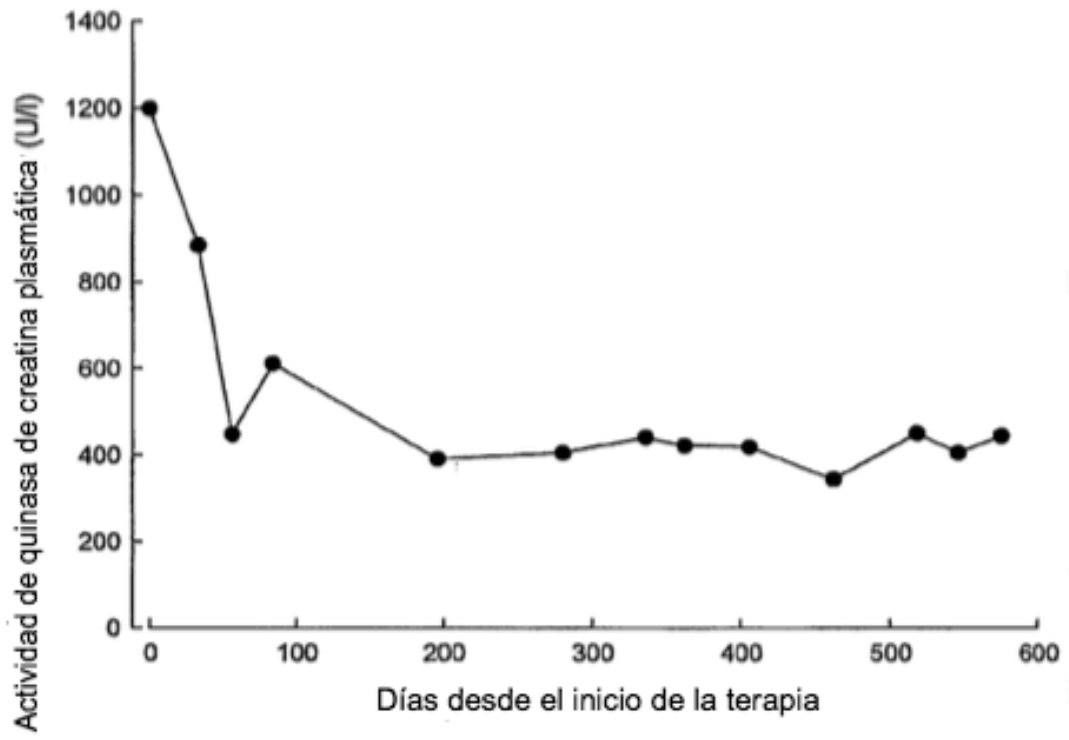


Fig. 12

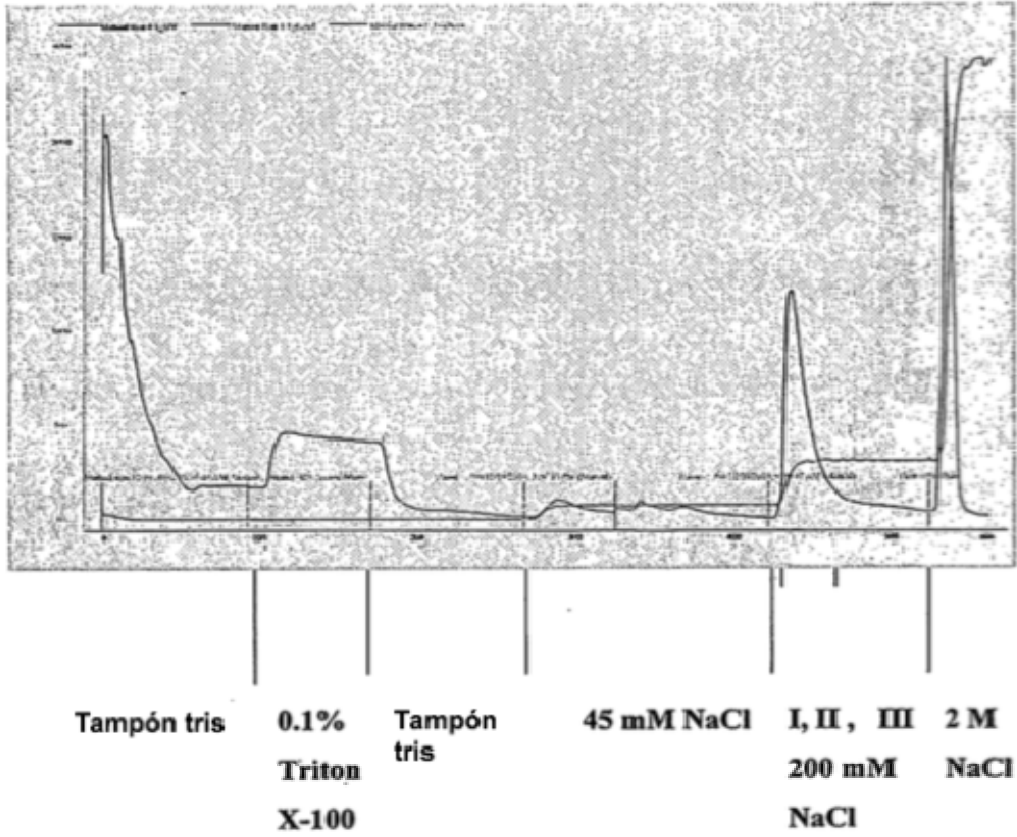


Fig. 13

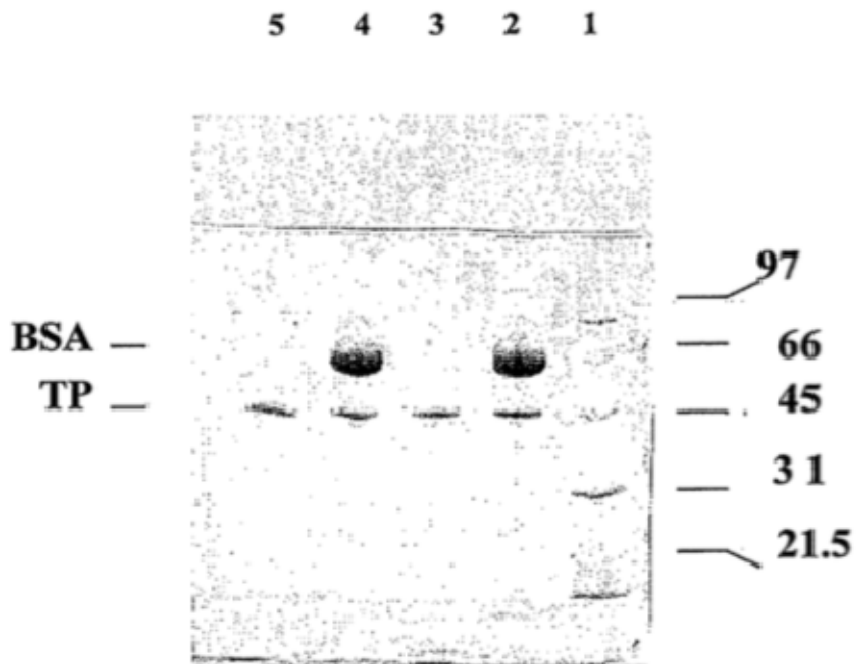


Fig. 14

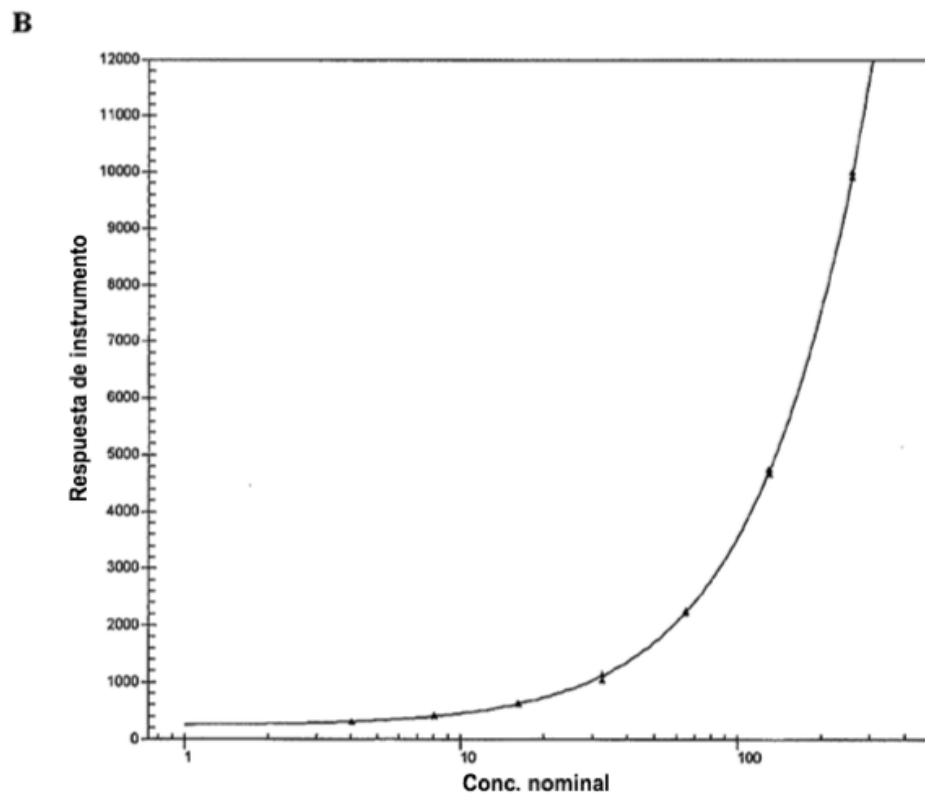
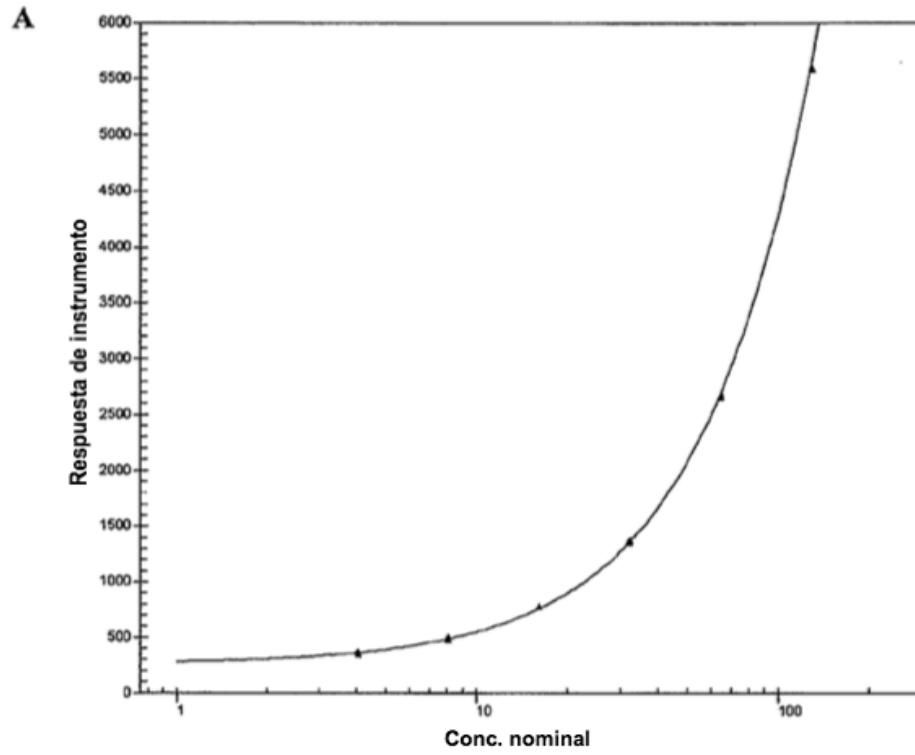


Fig. 15

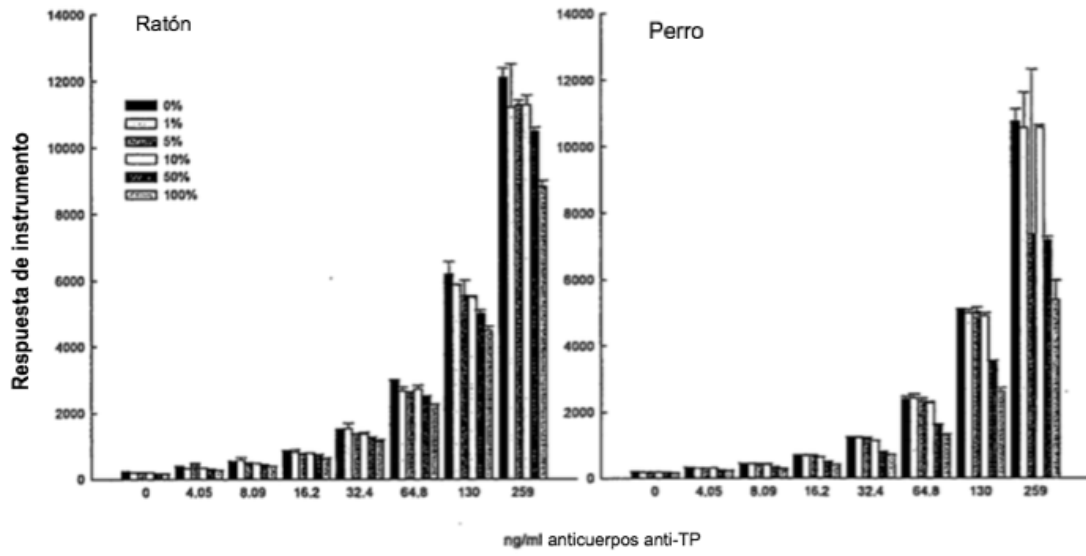
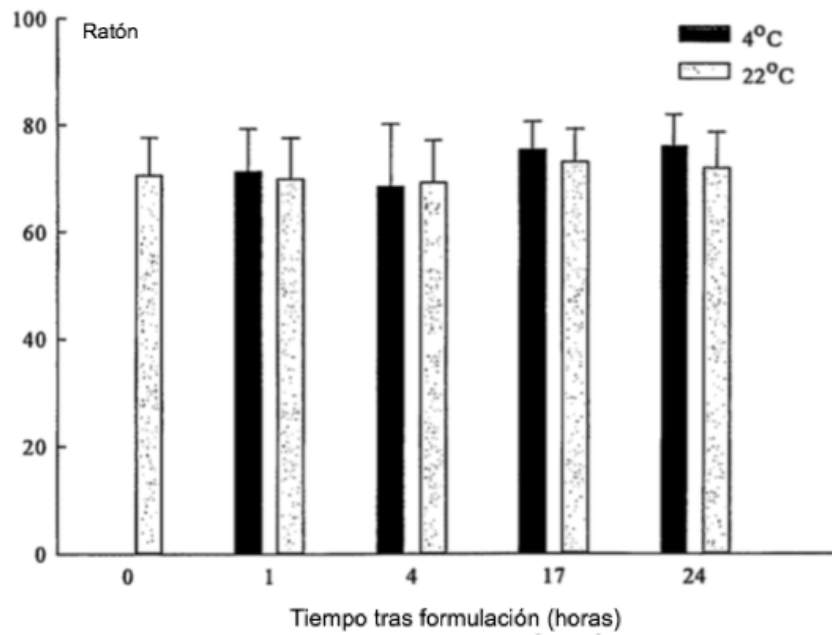


Fig. 16

A



B

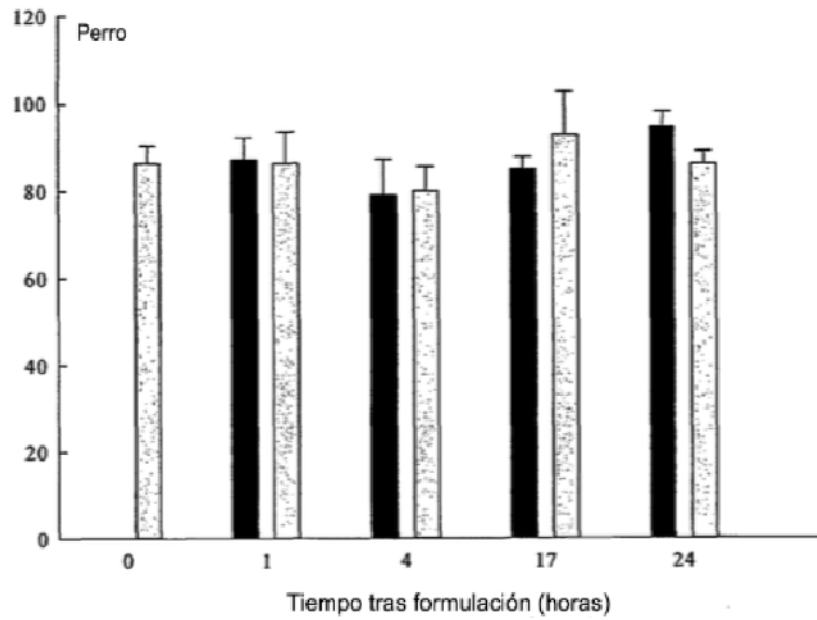


Fig. 17

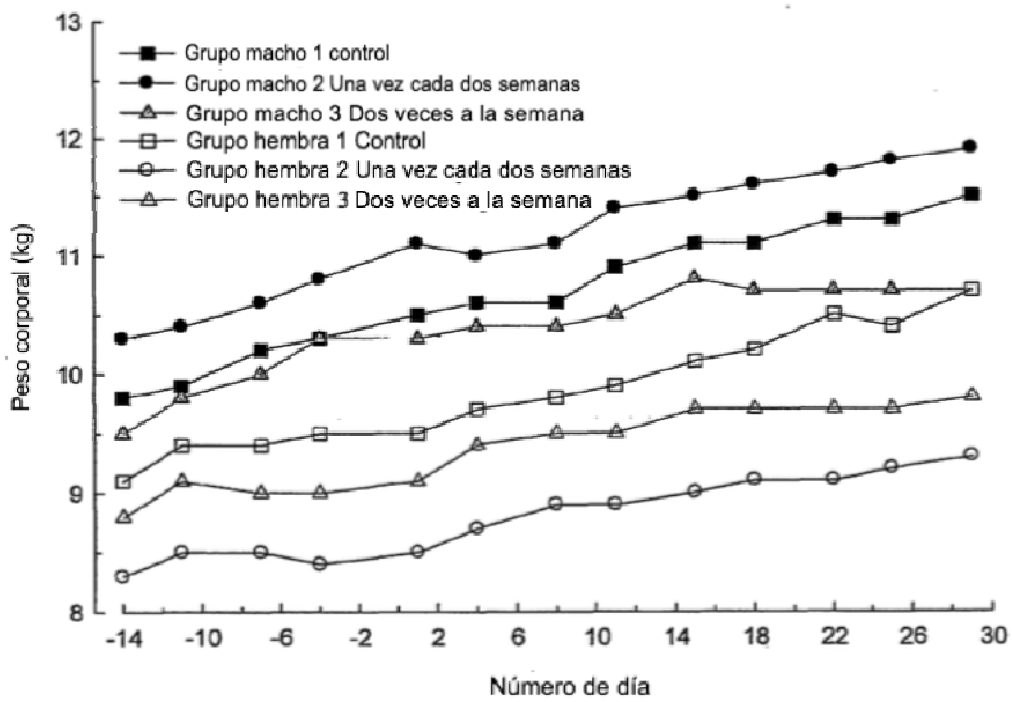


Fig. 18

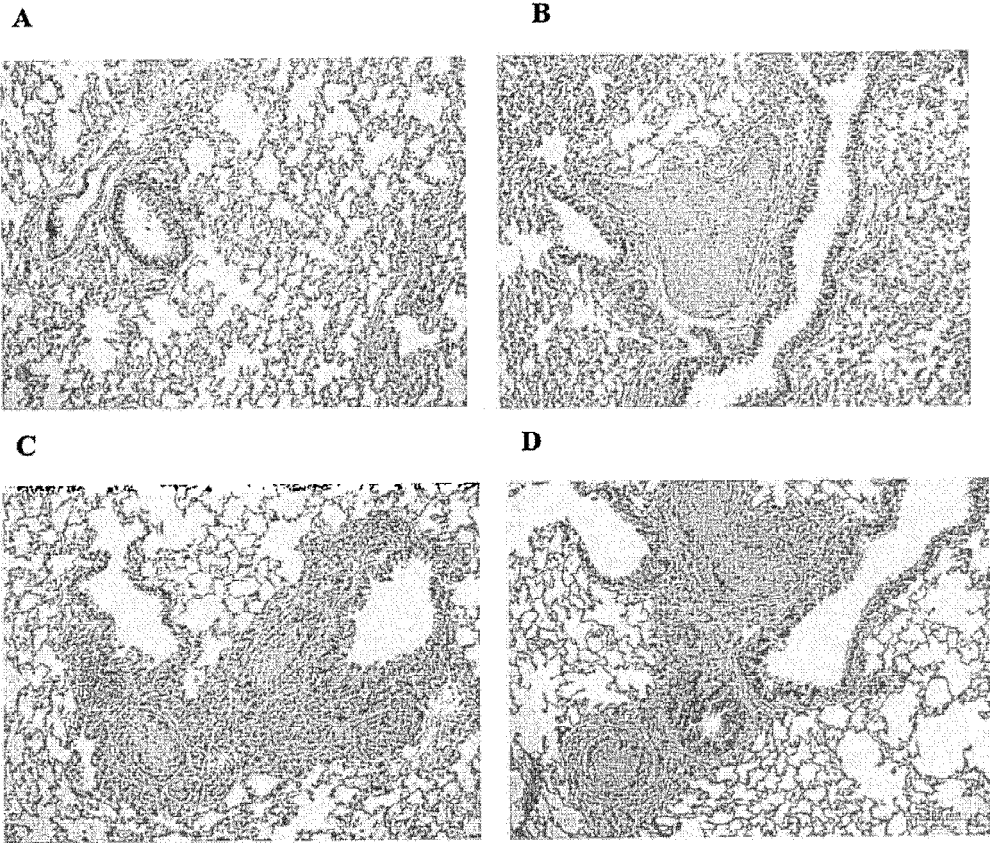
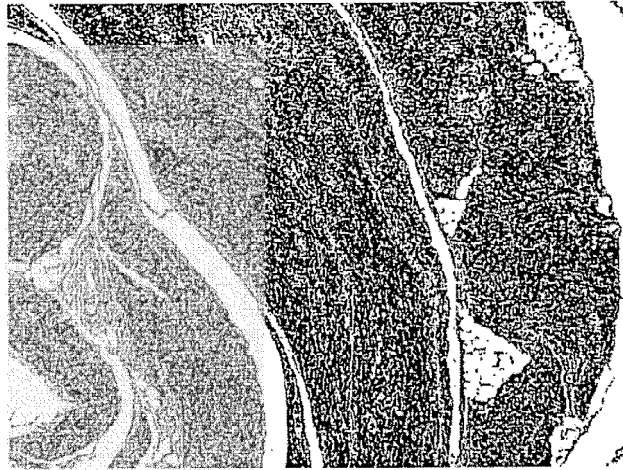
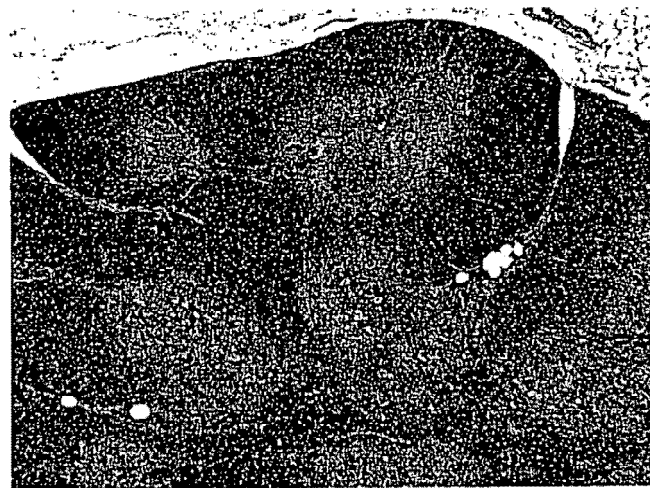


Fig. 19

A



B



C

