

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 343**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 35/18 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2014 PCT/EP2014/059327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14180897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2014 E 14726095 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2994116**

54 Título: **Procedimiento para estabilizar suspensiones de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo y las suspensiones obtenidas**

30 Prioridad:

07.05.2013 FR 1354204

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

31.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GODFRIN, YANN;
BOURGEAUX, VANESSA y
BAILLY, JÉRÔME**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 729 343 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para estabilizar suspensiones de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo y las suspensiones obtenidas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para estabilizar suspensiones de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo. La presente invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de tales suspensiones, los procedimientos de tratamiento que utilizan estas suspensiones y nuevas suspensiones estables de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo.

10 Se han descrito varios procedimientos para permitir la incorporación de principios activos en glóbulos rojos. Entre estos procedimientos, la denominada técnica de lisis-resellado es la más extendida. Esta técnica comprende tres variantes que son diálisis hipotónica, preexpansión hipotónica y dilución hipotónica, todas basadas en la diferencia de presión osmótica entre el interior y exterior de los glóbulos rojos. Estas variantes tienen en común las cinco etapas siguientes: se lava un residuo de células sanguíneas y se centrifuga una o más veces en tampón fisiológico, las glóbulos rojos se ponen en contacto con un medio líquido hipotónico que conduce a la apertura de poros en la membrana de los eritrocitos, el principio activo entra en los glóbulos rojos, los poros se cierran (se resellan) utilizando un tampón hipertónico, encerrando de este modo el principio activo dentro de las glóbulos rojos que a continuación se colocan en suspensión en una solución de conservación. El procedimiento de diálisis hipotónica es el más ventajoso y es objeto de desarrollo industrial. El procedimiento descrito en el documento EP 1 773 452 es el procedimiento que actualmente ofrece el mejor rendimiento y tiene la ventaja de ser reproducible y de mejorar el rendimiento de encapsulación del principio activo.

25 El documento US 2011/014171 da a conocer la encapsulación de agentes activos en eritrocitos en la que los eritrocitos resellados no se incuban.

La estabilidad de los productos obtenidos de este modo es un elemento clave para el uso de los mismos en terapia humana. En particular, la cantidad de hemoglobina extracelular contenida en el producto en el momento en que se inyecta en el paciente debe ser inferior a un umbral predeterminado. Por ejemplo, el umbral requerido por la Food and Drug Administration FDA estadounidense para la hemoglobina extracelular es 0,2 g/dl o inferior en el producto final utilizado para inyección humana.

35 Los productos obtenidos con los procedimientos de la técnica anterior se someten a hemólisis durante su período de almacenamiento y transporte antes de la inyección. Esta hemólisis, debido a la ruptura de los glóbulos rojos más frágiles, libera la hemoglobina en el medio extracelular, con el resultado de que estos productos ya no cumplen con los requisitos de la FDA en el momento en que se inyectan.

Es por tanto un objetivo de la invención proponer un procedimiento con el que es posible mejorar la estabilidad de las suspensiones de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo

40 Un objetivo en particular de la invención es proponer un procedimiento que permite producir suspensiones de glóbulos rojos que incorporan un principio activo y tienen un nivel de hemoglobina extracelular estable después del almacenamiento, o que permanecen en conformidad con las recomendaciones dadas por la FDA o cualquier otra autoridad sanitaria.

45 Otro objetivo de la invención es proponer dicho procedimiento aplicable a cualquier suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo, independientemente del procedimiento utilizado para la preparación del mismo, en particular usando un procedimiento de lisis-resellado.

50 Un objetivo adicional de la invención es proponer que dicho procedimiento permite la producción de una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo que se ha estabilizado y tiene un rendimiento celular alta.

Estos objetivos, y otros, se pueden alcanzar mediante la eliminación de los glóbulos rojos más frágiles de la suspensión resultante del proceso de encapsulación, es decir, post-resellado, a fin de obtener una suspensión que comprende glóbulos rojos resistentes a hemólisis en la mayor posible proporción. Por consiguiente, la suspensión de glóbulos rojos puede conservarse hasta el momento en que se inyecta en un paciente sin que la suspensión experimente una hemólisis significativa, por lo que es posible tener una suspensión disponible en el momento de la inyección que tenga un bajo nivel de hemoglobina extracelular. El procedimiento de la invención proporciona por lo tanto la eliminación de los glóbulos rojos más frágiles, de la hemoglobina extracelular y de principio activo extracelular. El solicitante lo ha conseguido de manera satisfactoria manteniendo un buen rendimiento celular, encontrando un buen compromiso entre la eliminación de los más frágiles y la retención de la cantidad máxima de los glóbulos rojos. El solicitante incluso ha sido capaz de determinar las condiciones que sorprendentemente permiten la estabilización de una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un principio activo, al tiempo que mejoran el rendimiento celular.

65 Por «que encapsulan» se entiende que el principio activo está esencialmente o completamente contenido en el

interior. «Esencialmente» significa que una proporción minoritaria de principio activo puede, no obstante, quedar atrapado en la membrana.

5 Por «que encapsula un principio activo» se entiende que los glóbulos rojos incorporan una molécula que tiene una función de principio activo, o que el conjunto formado por los glóbulos rojos y la molécula que incorpora tiene una función de principio activo.

10 Por «solución de incubación» se entiende la solución en la que están contenidos los glóbulos rojos que encapsulan un principio activo durante la etapa de incubación. La incubación puede llevarse a cabo en un intervalo de hematocrito amplio, en particular entre 10 y 85% de hematocrito.

15 Por «solución de conservación» se entiende la solución en la que se colocan los glóbulos rojos estabilizados que encapsulan un principio activo en suspensión en su forma adecuada para el almacenamiento hasta su uso. Una solución de conservación comprende preferiblemente al menos un agente de promoción de la conservación de los glóbulos rojos, seleccionado en particular de entre glucosa, dextrosa, adenina y manitol.

20 Por «glóbulos rojos frágiles» se entiende los glóbulos rojos, derivados del procedimiento de incorporación, que son propensos a la lisis de una vez en suspensión en una solución de conservación cuando la suspensión se almacena a entre 2 y 8°C, en particular después de 1 a 72 h.

Por «hematocrito inicial» se entiende el hematocrito antes de la pérdida de células debido a la lisis de los glóbulos rojos frágiles durante la incubación.

25 La noción de «estabilización» se evalúa esencialmente por la estabilidad en el tiempo de los glóbulos rojos que incorporan un principio activo, en particular en términos de pérdida del nivel de hemoglobina intracelular o hemoglobina extracelular.

30 Por «suspensión estabilizada de glóbulos rojos» se entiende en particular una suspensión que tiene un nivel de hemoglobina extracelular restante a 0,5 g/dl o inferior, en particular 0,3 g/dl o inferior, preferiblemente 0,2 g/dl o inferior hasta su uso en el hombre, produciéndose dicho uso posiblemente de 1 a 72 horas después de la producción del lote de glóbulos rojos que incorporan el principio activo. También puede caracterizarse por un índice de hemólisis que se mantiene a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior a las 72 h y el almacenamiento a una temperatura entre 2 y 8°C.

35 Por «suspensión estabilizada de glóbulos rojos listas para el uso» se entiende la suspensión estabilizada en una solución que permita la inyección a un paciente, en particular en una solución de conservación. Su hematocrito es generalmente 40% o superior.

40 Por «residuo de los glóbulos rojos» o glóbulos rojos empaquetados se entiende un concentrado de glóbulos rojos recogidos después de la separación de los glóbulos rojos del medio líquido en el que estaban antes en suspensión. La separación puede realizarse por filtración o centrifugación. La centrifugación es el medio utilizado generalmente para tal separación. Un residuo comprende una cierta proporción de medio líquido. En general, el hematocrito del residuo es de entre 70 y 85%.

45 El procedimiento puede aplicarse con independencia de la técnica utilizada para incorporar o encapsular el principio activo. Se puede aplicar más particularmente a la técnica principal de lisis-resellado, en particular usando la diálisis hipotónica, preferiblemente el procedimiento descrito en el documento EP 1 773 452 a la que los expertos en la técnica pueden referirse. Tal como se entenderá mediante la lectura de la siguiente descripción, el procedimiento de estabilización de la invención se puede aplicar a una suspensión o a un residuo de glóbulos rojos resellados que encapsulan el principio activo, o puede incluir las etapas de lisis y resellado realizadas hasta que se obtiene una suspensión o un residuo de glóbulos rojos resellados.

50 La presente invención se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los tratamientos o procedimientos de tratamiento se refieren a las composiciones de la presente invención para usar en un procedimiento de tratamiento. La presente invención tiene, por lo tanto, como objetivo un procedimiento para obtener una suspensión estabilizada de glóbulos rojos (RBC) que encapsulan un principio activo a partir de eritrocitos resellados que incorporan el principio activo. El procedimiento comprende la incubación de los glóbulos rojos resellados en una solución de incubación a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg. La incubación se lleva a cabo en particular durante un tiempo de 30 minutos o más, en particular, durante un tiempo de 1 hora o más. La incubación se llama post-resellado, es decir, que se realiza sobre los glóbulos rojos resellados. A continuación, el medio líquido se extrae de la suspensión incubada y los RBC obtenidos se colocan en suspensión en una solución que permita la inyección de la suspensión en un paciente, preferiblemente una solución de conservación que permite la inyección de la suspensión en un paciente.

65 La solución de incubación es típicamente una solución salina, que comprende al menos iones que permiten ajustar

la osmolalidad (por ejemplo, una solución basada en NaCl, KCl y/o fosfato). Puede comprender ingredientes adicionales, en particular hidratos de carbono, especialmente azúcares y/o aditivos ácidos y/o básicos que permiten el ajuste del valor del pH (en particular entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8,5, preferiblemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 7,5). La solución de incubación no comprende ningún agente que sea desnaturalizante para la membrana de RBC, tal como agentes químicos de puente o reticulación, tales como suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), glutaraldehído y neuraminidasa. Por lo tanto, es una solución de incubación inerte o una solución que no rompe la membrana de los glóbulos rojos resellados.

En una realización, el procedimiento comprende, antes de la incubación, encapsular mediante lisis-resellado del principio activo en glóbulos rojos y obtener RBC resellados que comprenden el principio activo.

Preferiblemente, se realiza un lavado (al menos 1 ciclo de lavado) de los RBC resellados antes de la incubación.

Los RBC resellados a los que se aplica el procedimiento pueden ser una suspensión de RBC en una solución de conservación. Es entonces posible para diluir la solución de conservación con solución de incubación con el fin de conseguir la osmolalidad en un valor según la invención. Alternativamente, los RBC se pueden separar de la solución de conservación, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, a continuación, se añade la solución de incubación. También es posible lavar los RBC resellados (al menos 1 ciclo, tal como se describe más adelante); el ciclo de lavado comprende preferentemente la dilución de la suspensión, a continuación, la separación, antes de ponerlos en suspensión en la solución de incubación. Los RBC resellados a los que se aplica el procedimiento también puede ser una suspensión de los RBC resellados que todavía están en la solución de resellado. Por tanto, es posible separar los RBC de la solución de resellado, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, y/o lavar los glóbulos rojos resellados (al menos 1 ciclo, tal como se describe más adelante); el ciclo de lavado comprende preferentemente la dilución de la suspensión, a continuación, la separación, antes de colocarlos en suspensión en la solución de incubación.

El procedimiento comprende por tanto la colocación y la incubación de los glóbulos rojos resellados en una solución de incubación a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg.

El objetivo de la presente invención es en particular un procedimiento para obtener una suspensión estabilizada de glóbulos rojos (RBC) que encapsulan un principio activo, que comprende la encapsulación de un principio activo en el interior de RBC a través de lisis-resellado, la obtención de una suspensión o residuo que contiene los RBC resellados que incorporan el principio activo, el lavado (al menos 1 ciclo de lavado) de los RBC resellados, a continuación, su colocación y la incubación en una solución de incubación a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg. La incubación se lleva a cabo en particular durante un tiempo de 30 minutos o más, en particular, durante un tiempo de 1 hora o más. A continuación, se extrae el medio líquido de la suspensión incubada y los RBC obtenidos se colocan en suspensión en una solución que permita la inyección de la suspensión en un paciente, preferiblemente una solución de conservación que permita la inyección de la suspensión en un paciente. La osmolalidad indicada es la de la solución en la que los RBC están en suspensión o en un residuo en el momento considerado.

El procedimiento conforme a la presente invención comprende en particular las siguientes etapas:

(a) encapsular un principio activo dentro de los RBC, que comprende poner en contacto con un medio hipotónico (que permite la apertura de poros en la membrana de los RBC), poner en contacto con el principio activo (para permitir la entrada en los RBC), resellar los RBC, en particular, usando un medio isotónico o hipertónico, ventajosamente hipertónico;

(b) obtener o preparar una suspensión o residuo que contiene glóbulos rojos que incorpora el principio activo y una solución a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg,

(c) incubar el residuo o suspensión de la etapa (b) como tal o después de la adición de una solución de incubación, a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg, durante un tiempo de 30 minutos o más, en particular 1 h o más;

(d) extraer el medio líquido de la suspensión incubada en la etapa (c),

(e) colocar los RBC obtenidos en (d) en suspensión en una solución que permita la inyección de la suspensión en un paciente, preferiblemente una solución de conservación que permita la inyección de la suspensión en un paciente.

Según una primera modalidad, la etapa siguiente después de la encapsulación mediante lisis-resellado, en particular, la etapa (b), comprende al menos 1 ciclo de lavado, preferiblemente 2 ó 3 ciclos de lavado, mediante dilución de la suspensión de residuo que comprende RBC resellados, por ejemplo, obtenido después de la etapa de lisis-resellado o etapa (a) en una solución a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y 330

5 mOsmol/kg , a continuación, la obtención de un residuo de RBC o una suspensión. Este residuo o esta suspensión contienen RBC que incorporan el principio activo y una solución a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg. Las siguientes etapas, por ejemplo, (c), (d) y (e) se aplican a continuación.

10 Las etapas siguientes después de la lisis-resellado, por ejemplo (b) a (e), se llevan a cabo bajo condiciones que conducen a la lisis de los glóbulos rojos frágiles o una mayoría de los mismos, en particular más de 50, 60, 70, 80 o 90%, o más. Para este propósito se puede actuar sobre el tiempo de incubación, la temperatura de incubación y la osmolalidad de la solución en la que los RBC están en suspensión. Cuanto mayor sea la osmolalidad, más largo será el tiempo de incubación. Cuanto menor sea la osmolalidad, más corto será el tiempo de incubación para obtener el mismo efecto. Del mismo modo, cuanto mayor sea la temperatura, más corto será el tiempo de incubación y a la inversa. Uno o más ciclos de lavado permitirán entonces la eliminación de restos de células y la hemoglobina extracelular, y del principio activo extracelular.

15 Según la invención, un ciclo de lavado comprende la dilución de la suspensión o residuo de los RBC, a continuación, la separación de los RBC y la solución de lavado. Preferiblemente, una etapa de lavado comprende preferiblemente 2 o 3 ciclos de dilución-separación. La separación se puede realizar utilizando cualquier medio adecuado, tal como filtración y centrifugación. Se prefiere la centrifugación. Se prefiere el lavado con la solución de incubación. La incubación no está limitada por el hematocrito de la suspensión. Por tanto, es posible incubar una suspensión que tiene un hematocrito inicial generalmente de entre 10 y 85%, en particular entre 40 y 80%. El término residuo es bastante más utilizado en y después del 70%, y la suspensión por debajo de este valor.

20 La etapa de eliminación o etapa (d) está destinada a «eliminar» la parte líquida de la suspensión incubada o residuo, en particular, para eliminar los restos celulares y la hemoglobina extracelular, y en consecuencia el principio activo extracelular.

25 Según una primera modalidad de la etapa de eliminación o etapa (d), se realiza una separación, en particular una centrifugación, siendo ésta particularmente aplicable a una suspensión. Esta separación puede ir seguida por uno o más, por ejemplo 2 o 3 ciclos de lavado mediante dilución en solución isotónica, seguido de separación en particular, por centrifugación.

30 Según una segunda modalidad de la etapa de eliminación o etapa (d), se lleva a cabo una dilución antes de la separación, en particular, mediante centrifugación, siendo ésta aplicable a una suspensión o un residuo. La dilución puede realizarse, en particular, con una solución de lavado isotónica o solución de conservación.

35 En la etapa final o etapa (e) se prepara la suspensión final, de manera que se puede administrar a un paciente, sin ningún otro tratamiento.

40 Según una primera modalidad de esta etapa, el residuo de RBC derivado de la etapa de eliminación o etapa (d) se diluye con la solución de inyección, en particular, solución de conservación.

45 Según una segunda modalidad de esta etapa, se realizan uno o más ciclos de lavado en el residuo de RBC derivado de la etapa de eliminación o etapa (d) con la inyección, en particular la solución de conservación, mediante dilución seguida de la separación. Después del lavado, los RBC se sustituyen en suspensión en la inyección, en particular, la solución de conservación.

El procedimiento de la invención puede comprender, además, una, varias o todas las características siguientes:

50 - la etapa de incubación o etapa (c) se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 39°C durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis de los RBC frágiles;

- la etapa de incubación o etapa (c) se lleva a cabo a baja temperatura, en particular entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10°C, en particular entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8°C, y dura de aproximadamente 1 h a aproximadamente 72 h, en particular de aproximadamente 6 h a aproximadamente 48 h, preferiblemente de aproximadamente 19 h a aproximadamente 30 h;

55 - la etapa de incubación o etapa (c) se realiza a una temperatura más alta de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 39°C, en particular a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) y dura de aproximadamente 30 min a aproximadamente 10 h, particularmente de aproximadamente 1 h a aproximadamente 6 h, preferiblemente de aproximadamente 2 h a aproximadamente 4 h; es posible trabajar a una temperatura aún más alta que la temperatura ambiente, pero esto puede tener un impacto negativo en el rendimiento celular, P50 y/o el contenido de 2,3-DPG;

60 - en la etapa de incubación o etapa (c), la suspensión tiene un hematocrito inicial de entre 10 y 85%, particularmente entre 40 y 80%; es posible incubar un residuo derivado de la separación que tiene un hematocrito de entre 70 y aproximadamente 85% por ejemplo, o un residuo diluido que tiene un hematocrito de entre aproximadamente 40 y 70%;

65 - la etapa de incubación comprende la agitación de la suspensión;

- la etapa de incubación no comprende ninguna agitación;

- como solución para el lavado y/o incubación, se utiliza una solución acuosa de NaCl a una concentración para obtener la osmolalidad deseada; por ejemplo una solución puede comprender NaCl al 0,9%; en particular, además de NaCl u otra fuente de sal (por ejemplo KCl, fosfato), esta solución también puede contener glucosa, en particular, monohidrato de glucosa, dihidrato de fosfato monosódico, dodecahidrato de fosfato disódico; por ejemplo, una composición comprende: 0,9% de NaCl, 0,2% de monohidrato de glucosa, 0,034% de dihidrato de fosfato monosódico, 0,2% de dodecahidrato de fosfato disódico;
- el lavado en la etapa final o etapa (e) se realiza con la solución de conservación;
- la osmolalidad de la solución (parte líquida) en la suspensión lista para usar o suspensión a inyectar en el paciente es de entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg;
- el hematocrito de la suspensión lista para usar o suspensión capaz de ser inyectada en el paciente es del 40% o superior;
- todas las etapas de lavado, incubación, se llevaron a cabo con la solución de conservación;
- la solución de lavado de la etapa (b) y/o la solución de lavado de la etapa (e) y la solución de conservación son de misma composición y comprenden uno o más compuestos que promueven la conservación de los glóbulos rojos;
- la solución de conservación (y cuando proceda, las soluciones de lavado o de incubación) es una solución acuosa que contiene NaCl, adenina y al menos un compuesto de entre glucosa, dextrosa y manitol;
- la solución de conservación (y cuando proceda, las soluciones de lavado o de incubación) contienen NaCl, adenina y dextrosa, preferiblemente medio AS3;
- la solución de conservación (y cuando proceda, las soluciones de lavado o de incubación) contienen NaCl, adenina, glucosa y manitol, preferiblemente medio SAG-manitol o medio Adsol.

La presente invención puede también definirse mediante un procedimiento para obtener una suspensión estabilizada de RBC que incorporan un principio activo, en particular que comprende las siguientes etapas:

- (a) encapsular un principio activo dentro de los RBC, que comprende poner en contacto con un medio hipotónico (que permite la apertura de poros en la membrana de los RBC), poner en contacto con el principio activo (para permitir la entrada del mismo en los RBC), resellar los RBC con un medio isotónico o hipertónico y recoger una suspensión o residuo de RBC que contiene un grupo de los llamados RBC frágiles a saber, que, una vez en suspensión en una solución de conservación, es probable que se sometan a lisis cuando la suspensión se almacena a entre 2 y 8°C, en particular después de 1 a 72 h,
- (b-c) lavado e incubación de los RBC obtenidos en (a) en una solución y bajo condiciones que conducen a la lisis de los RBC frágiles, o una mayoría de los mismos, en particular más del 50, 60, 70, 80 o 90%,
- (d) eliminar el medio líquido de la suspensión incubada en la etapa anterior,
- (e) suspender los RBC obtenidos en (d) en una solución que permite la inyección de la suspensión en un paciente, preferiblemente una solución de conservación que permite la inyección de la suspensión en un paciente.

Según una característica, la etapa (b) comprende la obtención o preparación de una suspensión o residuo que comprende RBC que incorporan el principio activo y una solución a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg.

Según una característica, la etapa (c) comprende la incubación del residuo o suspensión de la etapa (b) como tal o después de la adición de una solución de incubación a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg, durante un tiempo de 30 minutos o más, en particular 1 h o más.

Según una característica, la etapa (d) comprende el lavado de los RBC obtenidos en (c) para eliminar los restos celulares y la hemoglobina extracelular, en particular 2 o 3 ciclos de lavado.

Este procedimiento puede reproducir las dos realizaciones y sus diversas modalidades y características descritas en el presente documento.

Los procedimientos de la invención comprenden en particular la siguiente etapa:

- (a) encapsular un principio activo dentro de los RBC, que comprende poner en contacto con un medio hipotónico para abrir poros en la membrana de los RBC, poner en contacto con el principio activo para permitir la entrada de los mismos en los RBC, resellar los RBC usando un medio isotónico o hipertónico. Cabe indicar que el principio activo puede estar presente en la suspensión de los RBC antes de la lisis de los mismos, o se puede añadir durante la lisis o después de la lisis, pero siempre antes de resellar.

En una realización de esta etapa (a), el procedimiento comprende las siguientes subetapas:

- (a1) proporcionar una suspensión de glóbulos rojos a un hematocrito de no inferior del 60 o 65%,
- (a2) medir la fragilidad osmótica de los RBC en esta suspensión,
- (a3) procedimiento para la lisis e internalización del principio activo que comprende, el flujo de la suspensión de los RBC en un dispositivo de diálisis, en particular un tubo de diálisis, en flujo contrario a una solución de lisis, el ajuste del flujo de la suspensión de RBC o el ajuste del flujo de la solución de lisis, o ajuste de la osmolaridad de la solución de lisis en función de la fragilidad osmótica medida en (a2)

(a4) procedimiento para resellar los RBC.

En esta realización, la etapa (a1) comprende el lavado/centrifugación de un residuo celular, y la suspensión de los RBC lavados en un tampón fisiológico a un hematocrito de no inferior del 60 o 65%.

Preferiblemente, se mantiene una temperatura de 2 a 8°C durante las etapas (a1) y (a3) y, preferiblemente, la temperatura de los productos utilizados es de entre 2 y 8°C.

Preferiblemente, el proceso de resellado de los RBC se realiza utilizando una solución hipertónica y preferiblemente a una temperatura de entre 30 y 40°C, en particular aproximadamente 37°C.

Después de resellar, los RBC se separan del medio de resellado usando un procedimiento de separación, preferiblemente centrifugación. Después de la centrifugación, un residuo de los RBC se recoge en el tubo o recipiente de centrifugación. Según una característica ventajosa de la invención, la recogida se realiza de la totalidad o sustancialmente la totalidad de la fracción probable que contenga RBC para aumentar el rendimiento celular final después de la posterior eliminación de las células frágiles.

En una realización, el principio activo es la L-asparaginasa. Otras realizaciones comprenden la incorporación, preferiblemente encapsulación, de un principio activo seleccionado de entre: IHP, ADI, Factor VIII, Factor IX, alglucosidasa, beta-glucosidasa, bisfosfonatos, en particular 2ª y 3ª generación, uricasa, timidina fosforilasa, adenosina desaminasa, etcétera

Los RBC, entre las etapas (a) y (b) o después de la etapa (c) o (d), pueden someterse a un tratamiento adicional para modificar la superficie de los RBC o impartir funcionalidades a los mismos mediante injerto superficial o acoplamiento para modificar las propiedades de los mismos. Según una modalidad particular, este tratamiento se realiza después de la incubación, especialmente después de la etapa de incubación o después del lavado que sigue a la incubación. El tratamiento puede ser uno de los siguientes:

- tratamiento químico utilizando agentes modificadores de la superficie de los RBC, en particular, agentes puente o reticulación, tales como suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), glutaraldehído y neuraminidasa (agentes desnaturizantes);
- tratamiento térmico llevado a cabo, por ejemplo, bajo las siguientes condiciones: calentamiento de los RBC durante de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 90 minutos, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 minutos, a una temperatura entre aproximadamente 42 y aproximadamente 55°C, preferiblemente entre aproximadamente 47 y aproximadamente 51°C;
- formar un complejo inmunológico con un anticuerpo preferiblemente de subtipo IgG; por ejemplo anticuerpo anti-Rhesus, anticuerpo anti-glicoforina A y anticuerpo anti-CR1 (CR1 = receptor de complemento de tipo 1).

Otro objetivo de la invención es el uso de una etapa de incubación de una suspensión de RBC que, en particular encapsulan un principio activo, seguido de la eliminación del medio de incubación preferiblemente mediante lavado para eliminar el medio de incubación a fin de estabilizar los RBC o suspensión de RBC. Preferiblemente, este uso comprende además la etapa adicional de colocar los RBC en suspensión en una solución de conservación. Las diversas características más precisas mencionadas anteriormente se aplican a este objetivo de la invención.

En particular, según una característica, esta etapa de incubación comprende la incubación de una suspensión o residuo que contiene los RBC resellados que incorporan el principio activo y una solución a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, en particular entre aproximadamente 280 y aproximadamente 380 mOsmol/kg, preferiblemente entre aproximadamente 290 y aproximadamente 330 mOsmol/kg durante un tiempo de 30 minutos o más, en particular 1 h o más.

Más particularmente, según la invención, esta incubación puede comprender una o más de las siguientes características:

- la etapa de incubación se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 39°C, durante un tiempo suficiente para asegurar la lisis de los RBC frágiles;
- la etapa de incubación se lleva a cabo a baja temperatura, en particular entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10°C, más particularmente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8°C, y tiene una duración de aproximadamente 1 h a aproximadamente 72 h, en particular de aproximadamente 6 h a aproximadamente 48 h, preferiblemente de aproximadamente 19 h a aproximadamente 30 h;
- la etapa de incubación se realiza a una temperatura más alta de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 39°C, en particular a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) y dura de aproximadamente 30 min a aproximadamente 10 h, en particular de aproximadamente 1 h a aproximadamente 6 h, preferiblemente de aproximadamente 2 h a aproximadamente 4 h; es posible trabajar a una temperatura aún más alta que la temperatura ambiente, pero esto puede tener un impacto negativo en el rendimiento celular, P50 y/o el contenido de 2,3-DPG;
- en la etapa de incubación, la suspensión tiene un hematocrito inicial de entre 10 y 85%, en particular entre 40 y 80%; es posible incubar un residuo resultante de la separación que tiene un hematocrito de entre 70 y aproximadamente 85% por ejemplo, o un residuo diluido que tiene un hematocrito entre aproximadamente 40 y 70%;

- la etapa de incubación comprende la agitación de la suspensión;
- la etapa de incubación no comprende ninguna agitación.

5 Un objetivo adicional de la invención es una suspensión estabilizada de RBC que encapsulan un principio activo, capaz de ser obtenida mediante la implementación del procedimiento de la invención.

10 En particular, la suspensión, en solución de conservación, se caracteriza por un nivel de hemoglobina extracelular que se mantiene en 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o inferior, aún más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior a las 72 h y almacenamiento a una temperatura entre 2 y 8°C.

15 En particular, la suspensión en solución de conservación se caracteriza por un nivel de hemoglobina extracelular que se mantiene en 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o inferior, aún más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior durante un tiempo de entre 24 h y 20 días, en particular entre 24 y 72 h y almacenamiento a una temperatura de entre 2 y 8°C.

20 El nivel de hemoglobina extracelular se mide ventajosamente utilizando el procedimiento manual de referencia descrito por G.B. Blakney y A.J. Dinwoodie, en Clin. Biochem. 8, 96-102, 1975. El equipo automatizado también existe permitiendo esta medición cada uno en su propia sensibilidad particular. No obstante, se muestra en los ejemplos utilizando tres procedimientos diferentes que con el procedimiento de la invención es posible obtener un nivel conforme o que se pueden utilizar los tres procedimientos para este control.

25 En particular, la suspensión en solución de conservación se caracteriza por un índice de hemólisis que se mantiene a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior a las 72 h y el almacenamiento a una temperatura entre 2 y 8°C.

30 En particular, la suspensión en la solución de conservación se caracteriza por un índice de hemólisis que se mantiene a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior durante un tiempo entre 24 h y 20 días, en particular entre 24 y 72 h y a una temperatura entre 2 y 8°C.

35 En particular, el hematocrito de la suspensión no es del 40% o superior.

En una realización, el principio activo es la L-asparaginasa. Otras realizaciones comprenden la incorporación preferiblemente encapsulada de un principio activo seleccionado de entre: IHP, ADI, Factor VIII, Factor IX, alglucosidasa, beta-glucosidasa, bisfosfonatos, en particular 2ª y 3ª generación, uricasa, timidina fosforilasa, adenosina desaminasa, etc.

Ventajosamente, la suspensión en la solución de conservación está lista para usar, mientras que tienen un bajo nivel de hemoglobina extracelular, conformando en particular a las recomendaciones de la FDA.

40 Un objetivo adicional de la invención es un procedimiento de tratamiento terapéutico mediante inyección de una suspensión de RBC que encapsulan un principio activo.

45 En una primera realización de este procedimiento, la inyección se administra a un paciente en una suspensión de RBC que encapsulan un principio activo preparado entre 1 y 72 h, en particular entre 10 y 72 h antes de la inyección. El hematocrito de esta suspensión es 40% o superior. Está contenido en una solución de conservación. El nivel de hemoglobina extracelular es 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o menor, aún más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior, y/o el índice de hemólisis es 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior. La suspensión no se somete a lavado o similar antes de la inyección.

50 En otra realización, este procedimiento comprende las etapas de proporcionar un residuo celular, colocarlo en suspensión en tampón fisiológico a un hematocrito de 60 o 65% o superior, encapsular un principio activo en estos RBC usando lisis y procedimiento de resellado, incubar los RBC obtenidos, lavar los últimos y recoger una suspensión final de RBC. El hematocrito de la suspensión es 40% o superior. Está contenido en una solución de conservación. Esta suspensión se almacena a una temperatura entre 2 y 8°C. Esta suspensión final se inyecta en el paciente entre 1 h y 72 h, preferiblemente entre 24 y 72 h, después de la preparación de la suspensión. El nivel de hemoglobina extracelular de esta suspensión es 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o inferior, aún más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior y/o su índice de hemólisis es 2 o inferior, en particular 1,5, o inferior, preferentemente 1% o inferior. La suspensión no se somete a lavado o similar antes de la inyección.

55 Este procedimiento comprende en particular las siguientes etapas:
(a1) proporcionar una suspensión de RBC a un hematocrito de 60 o 65% o superior,
(a2) medir la fragilidad osmótica de los RBC en esta suspensión,
60 (a3) lisis y procedimiento de internalización de principio activo que comprende el flujo de la suspensión de RBC en un tubo de diálisis, en flujo contrario a una solución de lisis, ajuste del flujo de la suspensión de RBC o el ajuste del

flujo de la solución de lisis, o ajuste de la osmolaridad de la solución de lisis, en función de la fragilidad osmótica medida en (a2),

(a4) procedimiento de resellado de los RBC,

(b) opcionalmente al menos un ciclo de lavado mediante dilución de la suspensión o residuo obtenido en (a4) en una solución, la recogida de un residuo de RBC o suspensión en la solución de lavado,

(c) incubar el residuo o suspensión de la etapa (a4) o (b) como tal o después de la adición de una solución de incubación,

(d) eliminar el medio líquido de la suspensión incubada en la etapa (c),

(e) colocar los RBC obtenidos en (d) en suspensión en una solución que permite la inyección en un paciente, en particular una solución de conservación.

En una realización de este procedimiento, los RBC encierran L-asparaginasa. El principio activo también puede ser uno de los otros principios activos mencionados anteriormente, pero no se limita al mismo.

La presente invención se describirá ahora con más detalle con la ayuda de realizaciones tomadas como ejemplos no limitativos con referencia al dibujo en el que la única figura esquematiza el procedimiento descrito en el documento EP 1 773 452 y el procedimiento de la invención, y proporciona los resultados obtenidos para cada uno de los mismos en términos de hemoglobina extracelular durante un período de 72 horas.

Los ejemplos sin un principio activo encapsulado no están en el alcance de las reivindicaciones.

Los RBC preparados según el documento EP 1 773 452 sin etapa de incubación adicional son ejemplos comparativos.

Ejemplo 1: Incubación de glóbulos rojos en NaCl + glucosa a temperatura ambiente durante un período variable

Se trataron residuos de RBC humanos en ausencia o presencia de principio activo (L-asparaginasa) siguiendo el procedimiento descrito en la patente EP 1 773 452 hasta la finalización del resellado y se recogieron suspensiones de RBC en bolsas de sangre. Las bolsas de RBC se transfirieron a un lavador (Cobe 2991). Las suspensiones se prediluyeron con NaCl al 0,9% y glucosa al 0,2%, a continuación, se transfirieron a bolsas de centrifugación. Las suspensiones se centrifugaron a 3.000 rpm durante 2 min. Los sobrenadantes se dirigieron entonces hacia la bolsa de residuos a un flujo de salida de sobrenadante ajustado a 350 ml/min. La operación de dilución/centrifugación se repitió dos veces más para terminar el ciclo de lavado. Las bolsas de centrifugación que contenían RBC al 80% de hematocrito se dejaron a temperatura ambiente ($24 \pm 5^\circ\text{C}$) en el lavador durante 30 min, 1h o 3h. Después de la incubación, se llevó a cabo otro ciclo de lavado. Los RBC fueron a continuación reemplazados en suspensión con 100 ml de solución de conservación AS-3 (Caridian BCT) y se almacenaron a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. La estabilidad del producto se determinó mediante la medición de la hemoglobina extracelular en el día de fabricación (D0), a continuación, 24 horas más tarde (D1), y 48 h más tarde (D2), etc. Esta medición se realizó utilizando dos procedimientos: con un analizador automático (Cell Dyn Ruby: medición a 555 nm, linealidad de la hemoglobina 0,0-25,0 g/dl \pm 0,3, coeficiente de variación <2,0% - uso de la función de ruido de fondo para medir trazas de hemoglobina, sensibilidad mejorada a \pm 0,2 g/dl; o analizador automatizado Excell 2280: medido a 540 nm, linealidad de la hemoglobina 1,5-30,0 g/dl \pm 0,1, coeficiente de variación 1%), o mediante espectrofotometría visible a 577 nm siguiendo el procedimiento del manual de referencia descrito por G.B. Blakney y A.J. Dinwoodie, en Clin. Biochem. 8, 96-102, 1975. En los ejemplos, los analizadores automatizados se utilizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados se proporcionan a continuación.

1.1 Medición de la hemoglobina extracelular (en g/dl) llevada a cabo usando el analizador de Ruby sobre 4 suspensiones de RBC que encapsulan L-asparaginasa:

	Lote No.	D0	D1	D2	D3
Incubación 3 horas a temperatura ambiente	PH-PF001-130115-01	0,000	0,000	0,007	0,007
	PH-PF001-130115-02	0,015	0,022	0,022	0,007
	PH-PF001-130116-01	0,030	0,030	0,040	0,030
	PH-PF001-130116-02	0,000	0,007	0,007	0,013
	PH-PF001-130117-01	0,007	0,020	0,010	0,030

1.2 Medición de la hemoglobina extracelular (en g/dl) mediante espectrofotometría en 3 suspensiones de RBC que encapsulan (ERY-ASP-121217-CG) o no encapsulan (ERY-121210-MA y ERY-121217-QB) L-asparaginasa:

	Lote No.	D0	D1	D2	D3	D4
Incubación 3 horas a temperatura ambiente	ERY-121210- MA	0,120	0,120	0,127	0,141	0,188
	ERY-121217- QB	0,123	0,146	0,139	0,152	-
	ERY-ASP- 121217-CG	0,084	0,077	0,081	0,098	-

1.3 Medición de la hemoglobina extracelular (en g/dl) utilizando el analizador de Excel 2280 en 2 suspensiones de RBC; la primera que encapsula L-asparaginasa, la segunda con ningún principio activo:

	Lote No.	D0	D1	D2	D3	D4
1 hora a temperatura ambiente	ERY-ASP- 130228-EC	0,11	-	-	-	0,18
30 min a temperatura ambiente	GR-LR- 130325-QB	0,12	0,11	0,12	0,12	0,12

5 Este procedimiento que comprende una etapa de incubación de RBC en NaCl + glucosa (tiempo que varía entre 30 min y 3 h) permitió obtener un producto estable con niveles de hemoglobina extracelular inferior a 0,2 g/dl en D3 (72 h) e incluso durante más tiempo hasta D8 es decir, 8 días después de la fabricación del producto. Estos resultados fueron confirmados mediante la medición de la hemoglobina extracelular efectuada utilizando 3 procedimientos diferentes.

Ejemplo 2: Cambios en los niveles de hemoglobina extracelular durante la incubación a temperatura ambiente.

15 Se trató un residuo de RBC humanos como en el Ejemplo 1, sin contener ningún principio activo. Durante la incubación se tomaron alícuotas a temperatura ambiente, se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron y se determinó el nivel de hemoglobina mediante espectrofotometría visible a 577 nm. Los resultados se proporcionan a continuación:

Tiempo de incubación a temperatura ambiente en horas	0	0,5	1	2	3
3Hemoglobina en sobrenadante (g/dl)	1,418	1,848	2,063	2,793	3,089

20 Los resultados muestran que la hemólisis de los RBC fue constante durante el tiempo de incubación de 3 h en NaCl + glucosa a temperatura ambiente. Por tanto, esta etapa de incubación hace una contribución significativa hacia la eliminación de los RBC más frágiles y por lo tanto es indispensable para el procedimiento con el fin de obtener un producto final estable. El tiempo de incubación, sin embargo, se puede reducir a 30 min, tal como se muestra en el Ejemplo 1. Los RBC frágiles no hemolizados durante la etapa de incubación, sin embargo, se debilitan durante esta etapa y estallan durante el lavado final.

Ejemplo 3: La incubación de RBC en solución de conservación (AS-3 o SAG-manitol) a 5 ± 3°C durante 24 h

30 Los residuos de RBC se trataron siguiendo el procedimiento descrito en la patente EP 1 773 452 hasta la finalización del resellado y se incorporó L-asparaginasa. Las bolsas de RBC se transfirieron a un lavador (Cobe 2991). Las suspensiones se prediluyeron con NaCl al 0,9% y glucosa al 0,2%, a continuación, se transfirieron a bolsas de centrifugación. Las suspensiones se centrifugaron a 3.000 rpm durante 2 min. Los sobrenadantes se dirigieron a continuación hacia la bolsa de residuos a un flujo de salida de sobrenadante de 350 ml/min. La operación de dilución/centrifugación se repitió dos veces más para terminar el ciclo de lavado. Las suspensiones de RBC al 80% de hematocrito fueron entonces reemplazados en suspensión con 100 ml de solución de conservación AS-3 o 80 ml de SAG-manitol. Las bolsas de RBC al ~ 50% de hematocrito fueron entonces almacenadas 24 horas a 5 ± 3°C, a continuación, se lavaron antes de resuspenderse en 100 ml de solución de conservación AS-3 (Caridian BCT). Los productos finales se almacenaron a entre 2 y 8°C. La estabilidad del producto se determinó mediante la medición de la hemoglobina extracelular en el día de fabricación (D0), entonces 24 h más tarde (D1), 48 h más tarde (D2), etc. Esta medición se realizó utilizando espectrofotometría visible a 577 nm. Los resultados se proporcionan a continuación:

Tiempo de incubación y temperatura	Solución de incubación	Lote No.	D0	D1	D2	D3	D7
24 h/5±3°C	SAG-Manitol	ERY-ASP-121211-CG	0,107	0,118	0,187	-	0,187
	SAG-Manitol	ERY-ASP-121218-CG	0,06	0,073	0,088	-	-
	AS-3	ERY-ASP-121218-MA	0,104	0,128	0,140	-	-

La incubación de los RBC en AS-3 o SAG-Manitol condujo a resultados similares. Los productos exhiben muy buena estabilidad durante al menos 48 horas con niveles de hemoglobina extracelular menores que 0,2 g/dl, y se pueden esperar resultados similares en D7, tal como se muestra para el lote ERY-ASP-121211-CG-01.

5

Ejemplo 4: Mejora en el rendimiento celular

El procedimiento reivindicado, tal como se ilustra en el ejemplo 1, conduce a una mejor estabilidad del producto. Sin embargo, esto tiene un impacto negativo en el rendimiento celular del procedimiento (~ 55% frente a ~ 65% para el procedimiento descrito en el documento EP 1 773 452). Para obtener un mejor rendimiento celular mientras se mantiene una buena estabilidad del producto, uno de los parámetros de lavado se modificó para los 2 ciclos del procedimiento reivindicado. En resumen, los lotes fueron producidos bajo las condiciones del ejemplo 1 con la excepción del flujo de salida del sobrenadante ajustado a 100 ml/min en lugar de 350 ml/min, durante centrifugaciones de las suspensiones celulares. Esto permitió que el detector de RBC realizara una detección más rápida del límite entre el sobrenadante y los RBC. La cantidad de RBC enviada a la bolsa de residuos se redujo y se incrementó el rendimiento celular del procedimiento. El rendimiento medio para el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 es del 73% frente al 54% para el procedimiento en el Ejemplo 1. La estabilidad del producto es sustancialmente la misma.

10

15

Medición de la hemoglobina extracelular (g/dl) mediante espectrofotometría Excell 2280 y el rendimiento celular en %:

20

	D0	D1	D2	D3	Rendimiento celular
Procedimiento en EP1773452	0,3 ± 0,08	0,83 ± 0,22	1 ± 0,22	1,08 ± 0,22	~65% (media de 189 lotes)
Procedimiento en el ejemplo 1	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,03	~54 ± 3% (media de 5 lotes)
Procedimiento en el ejemplo 4	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,15 ± 0,06	~73 ± 5% (media de 9 lotes)

Ejemplo 5: Reducción del nivel de hemoglobina extracelular después de la optimización del procedimiento de producción

La única figura compara los niveles de hemoglobina extracelular que se encuentran en los productos producidos según el procedimiento descrito en la patente EP 1 773 452 con los del procedimiento en el Ejemplo 1. La reducción de la hemoglobina extracelular después de un tiempo de almacenamiento de 72 h es significativa, ya que disminuye de 1,5 g/dl para el procedimiento en el documento EP 1 773 452 a un valor por debajo de 0,2 g/dl después de la optimización, es decir una reducción en el nivel de hemoglobina de más de 7.

25

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para obtener una suspensión estabilizada de glóbulos rojos (RBC) que encapsulan un principio activo, a partir de RBC resellados que incorporan el principio activo, comprendiendo el procedimiento la incubación de los RBC resellados en una solución de incubación, a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, durante un tiempo de 30 minutos o más, siendo la solución de incubación una solución que no contiene un agente puente o de reticulación que es desnaturalizante para la membrana de los RBC, el medio líquido se extrae a continuación de la suspensión incubada y los RBC obtenidos se colocan en suspensión en una solución que permite la inyección de la suspensión en un paciente.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende, antes de la incubación, encapsular mediante lisis-resellado el principio activo en los RBC y obtener los RBC resellados que comprenden el principio activo.
- 15 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, en el que la incubación se realiza a una osmolalidad de entre 280 y 380 mOsmol/kg.
- 20 4. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, en el que la incubación se realiza a una osmolalidad de preferiblemente entre 290 y 330 mOsmol/kg.
- 25 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la incubación tiene una duración que es de 1 h o más.
- 30 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además el lavado de los RBC resellados antes de la incubación.
- 35 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el lavado comprende al menos un ciclo de lavado que comprende la dilución de una suspensión de los RBC resellados en una solución o colocación de la misma, a una osmolalidad de no inferior de 280 mOsmol/kg, a continuación, la separación.
- 40 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que el lavado comprende 2 o 3 ciclos de lavado.
- 45 9. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
 (a) encapsular un principio activo dentro de los RBC, que comprende poner en contacto con un medio hipotónico, poner en contacto con el principio activo, resellar los RBC;
 35 (b) obtener una suspensión o residuo que comprende RBC que incorporan el principio activo y una solución a una osmolalidad de 280 mOsmol/kg o superior;
 (c) incubar el residuo o suspensión de la etapa (b) como tal o después de la adición de una solución de incubación a una osmolalidad de 280 mOsmol/kg o superior, durante un tiempo de 30 minutos o más;
 40 (d) eliminar el medio líquido de la suspensión incubada en la etapa (c),
 (e) colocar en suspensión los RBC obtenidos en (d) en una solución que permite la inyección de la suspensión en un paciente, preferiblemente una solución de conservación que permite la inyección de la suspensión en un paciente.
- 45 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la etapa (b) comprende al menos 1 ciclo de lavado, mediante dilución de la suspensión o residuo obtenidos en (a) en una solución, a una osmolalidad de 280 mOsmol/kg o superior, a continuación, la obtención de un residuo o suspensión de RBC.
- 50 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que en la etapa (d) se realiza una separación o una dilución antes de la separación.
- 55 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa de incubación se realiza a una temperatura de entre 2 y 39°C.
- 60 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que:
 - la etapa de incubación se lleva a cabo a baja temperatura entre 2 y 10°C, y tiene una duración de 1 h a 72 h; o
 - la etapa de incubación se realiza a una temperatura entre 20 y aproximadamente 39°C y tiene una duración de 30 min a 1 h.
- 65 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la recuperación de una suspensión de RBC estabilizada que tiene un nivel de hemoglobina extracelular mantenido a 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o inferior, más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior y/o un índice de hemólisis mantenido a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior a las 72 h después de colocar en suspensión en la solución de conservación y a una temperatura de entre 2 y 8°C.
- 70 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la recuperación de una suspensión de RBC estabilizada que tiene un nivel de hemoglobina extracelular mantenida a 0,5 o inferior, en

particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o menor, más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior y/o un índice de hemólisis mantenido a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior durante un tiempo de entre 24 h y 20 días, en particular entre 24 y 72 h después de colocar en suspensión en la solución de conservación y a una temperatura de entre 2 y 8°C.

5 16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el principio activo se selecciona de entre: L-asparaginasa, IHP, ADI, Factor VIII, Factor IX, alglucosidasa, beta-glucosidasa, bisfosfonatos, en particular 2ª y 3ª generación, uricasa, timidina fosforilasa, adenosina desaminasa.

10 17. Suspensión estabilizada de RBC que encapsulan un principio activo, que puede obtenerse mediante la implementación del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

15 18. Suspensión, según la reivindicación 17, **caracterizada por** un nivel de hemoglobina extracelular mantenido a 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o inferior, más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior y/o un índice de hemólisis mantenido a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior a las 72 h después de colocar en suspensión en la solución de conservación y a una temperatura de entre 2 y 8°C.

20 19. Suspensión, según la reivindicación 17, **caracterizada por** un nivel de hemoglobina extracelular mantenida a 0,5 o inferior, en particular 0,3 o inferior, más particularmente 0,2 o inferior, preferiblemente 0,15 o inferior, más preferiblemente 0,1 g/dl o inferior y/o un índice de hemólisis mantenido a 2 o inferior, en particular 1,5 o inferior, preferiblemente 1% o inferior durante un tiempo de entre 24 h y 20 días, en particular entre 24 y 72 h después de colocar en suspensión en la solución de conservación y a una temperatura de entre 2 y 8°C.

25 20. Suspensión, según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en la que el principio activo se selecciona de entre: L-asparaginasa, IHP, ADI, Factor VIII, Factor IX, alglucosidasa, beta-glucosidasa, bisfosfonatos, en particular 2ª y 3ª generación, uricasa, timidina fosforilasa, adenosina desaminasa.

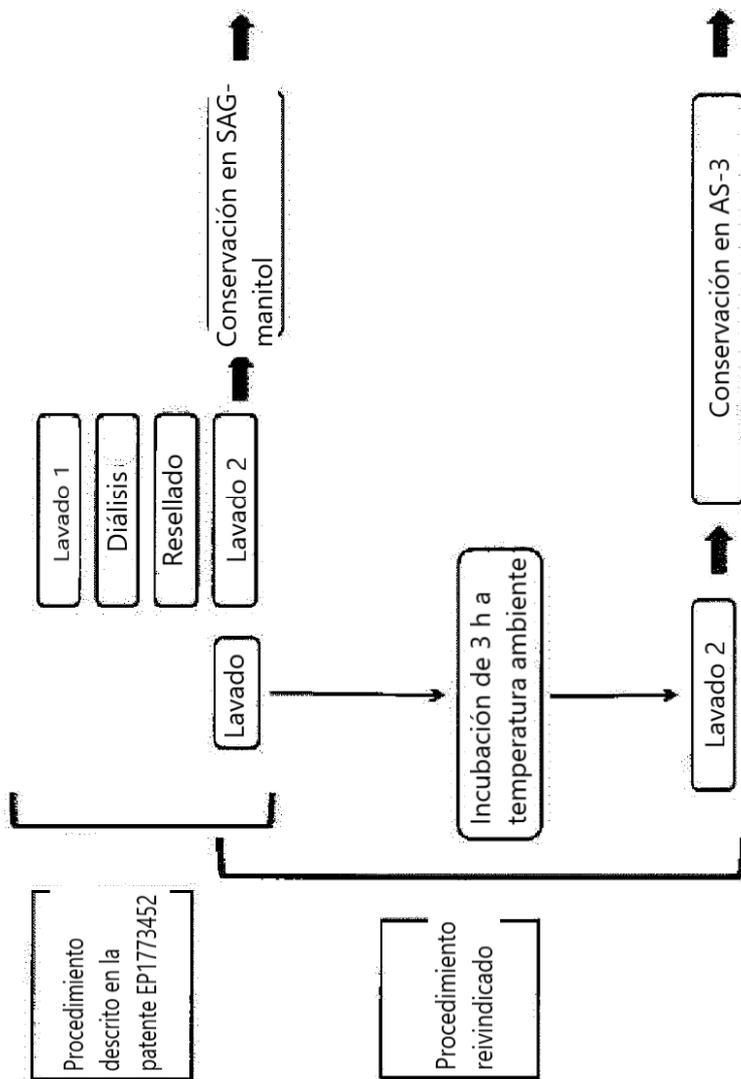
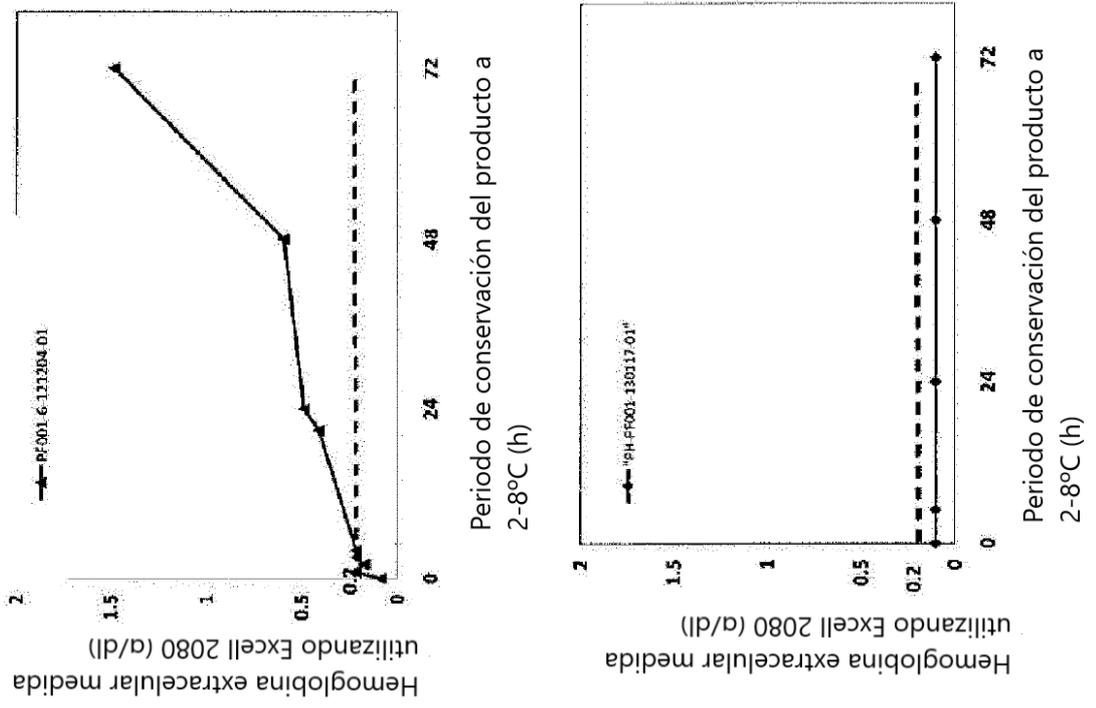


Fig. 1