

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 828**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**A61K 38/44** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2014 PCT/EP2014/062156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14198788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2014 E 14730144 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3007715**

54 Título: **Composición de eritrocitos que encapsulan fenilalanina hidroxilasa y utilización terapéutica de la misma**

30 Prioridad:  
**11.06.2013 EP 13305786**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.09.2020**

73 Titular/es:  
**ERYTECH PHARMA (100.0%)  
60 Avenue Rockefeller  
69008 Lyon, FR**

72 Inventor/es:  
**GODFRIN, YANN;  
DUFOUR, EMMANUELLE;  
CHENG, SENG H. y  
YEW, NELSON S.**

74 Agente/Representante:  
**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 782 828 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

Composición de eritrocitos que encapsulan fenilalanina hidroxilasa y utilización terapéutica de la misma

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a la terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés), basada en la fenilalanina hidroxilasa y composiciones destinadas a este uso.
- 10 **[0002]** Niveles elevados o alterados de aminoácidos en la sangre son una herramienta de diagnóstico para algunos trastornos metabólicos congénitos. Un ejemplo es la fenilcetonuria (FCU), un trastorno autosómico recesivo causado por una deficiencia en la fenilalanina hidroxilasa (PAH), que metaboliza la fenilalanina (Phe) a tirosina en presencia de oxígeno molecular, hierro y el cofactor tetrahidrobiopterina esencial (BH<sub>4</sub>) [7, 8]. La enzima se encuentra de forma natural en el hígado, donde cataliza la hidroxilación de L-fenilalanina a L-tirosina usando el co-factor BH<sub>4</sub> y oxígeno molecular [22]. Si no se trata, los niveles de fenilalanina en la sangre se elevan a niveles extremadamente altos, lo que lleva a un deterioro neurocognitivo y finalmente a un retraso mental. El cribado genético identifica ahora recién nacidos con FCU y se colocan inmediatamente en una dieta restringida de Phe [9]. Sin embargo, el cumplimiento de la dieta severa empeora durante la infancia y la adolescencia, y sigue habiendo una necesidad médica no satisfecha para este trastorno [10].
- 15 **[0003]** La ERT a menudo se ha visto obstaculizada por la rápida eliminación y degradación de la enzima administrada, lo que limita la eficacia y requiere una dosificación frecuente. La sensibilidad proteolítica de enzimas proteicas y la inmunogenicidad potencial de una enzima recombinante o una enzima de origen microbiano a menudo excluye el uso de enzimas no estabilizadas como una terapia oral o de inyección directa.
- 20 **[0004]** La FCU se define por la U.S National Library of Medicine in the Genetics Home Reference (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/phenylketonuria>) de la siguiente manera: La fenilcetonuria (comúnmente conocida como FCU) es un trastorno hereditario que aumenta los niveles de una sustancia llamada fenilalanina en la sangre. La fenilalanina es un bloque de construcción de proteínas (un aminoácido) que se obtiene a través de la dieta. Se encuentra en todas las proteínas y en algunos edulcorantes artificiales. Si la fenilcetonuria no se trata, la fenilalanina puede acumularse a niveles peligrosos en el cuerpo, provocando un retraso mental y otros problemas de salud graves.
- 25 **[0005]** Los signos y síntomas de la FCU varían de leves a graves. La forma más grave de este trastorno es conocido como la FCU clásica. Los bebés con FCU clásica parecen normales hasta que tienen unos pocos meses de edad. Sin tratamiento, estos niños desarrollan una discapacidad intelectual permanente. Convulsiones, retraso en el desarrollo, problemas de conducta y trastornos psiquiátricos también son comunes. Los individuos no tratados pueden tener un olor a humedad o similar a un ratón como efecto secundario de un exceso de fenilalanina en el cuerpo. Los niños con FCU clásica tienden a tener la piel y el pelo más claros que los miembros de la familia no afectados y también son propensos a tener trastornos de la piel, tales como eczema.
- 30 **[0006]** Las formas menos graves de esta enfermedad, a veces llamada variante de FCU y hiperfenilalaninemia no FCU, tienen un menor riesgo de daño cerebral. Las personas con casos muy leves pueden no requerir tratamiento con una dieta baja en fenilalanina.
- 35 **[0007]** La PAH de mamíferos es una enzima multimérica, multidominio, grande (200 kD como un tetrámero) y, según algunos autores, con una actividad específica relativamente baja [12]. La PAH de la cianobacteria *Chromobacterium violaceum*, que es un monómero de 33 kD, es más estable térmicamente y se ha descrito que más activa que la enzima de mamífero [13]. La fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima tetramérica grande (240 kD) que convierte Phe a ácido trans-cinámico y amoniaco.
- 40 **[0008]** El documento WO96/39098 da a conocer un dispositivo destinado a ser implantado en un vaso sanguíneo y que permite que una molécula se difunda fuera del dispositivo al torrente sanguíneo. La molécula es secretada por las células viables presentes en una cápsula en el dispositivo. Se proponen células productoras de fenilalanina hidroxilasa para tratar la fenilcetonuria.
- 45 **[0009]** Una persona que desee desarrollar una terapia para FCU se enfrenta a la sensibilidad inherente de la proteasa y la inmunogenicidad potencial de estas enzimas. El requisito del cofactor para la PAH es una dificultad adicional. La protección de la enzima frente a la respuesta inmune y la degradación de la proteasa se han logrado mediante conjugación química con polietilenglicol (PEG) (pegilación) de la proteína. La PAH humana de longitud completa, PAH humano doble truncada y PAH de *C. violaceum* se han pegilado y mostraron una mayor actividad específica con respecto a la forma nativa [22].
- 50 **[0010]** Indica que la actividad del complejo y el requisito del cofactor, además de la sensibilidad de la proteasa inherente y la inmunogenicidad potencial en una persona que carece de la enzima funcional hace que la ERT sea complicada. [23] recuerda que la ERT con PAH requiere el complejo multienzimático intacto para la actividad de hidroxilación catalítica y que, para que sea terapéuticamente viable, se han construido formas truncadas de PAH en un intento de estabilizar y aumentar la actividad catalítica, mientras que la protección de la enzima contra la respuesta
- 55
- 60

inmunitaria la respuesta se ha logrado mediante la pegilación de la proteína. Sin embargo, [23] considera que dados los inconvenientes de la enzima PAH, su viabilidad como agente terapéutico sigue siendo discutible. Esta es la razón por la que [23] exploró la enzima PAL como un sustituto potencial para PAH y desarrolló formas pegiladas de esta enzima con el fin de superar la potencial degradación proteolítica y la inmunogenicidad.

5 **[0011]** Todavía hay una necesidad de una terapia ERT novedosa y eficiente para FCU.

10 **[0012]** Los glóbulos rojos (RBC) han sido durante mucho tiempo de interés como portadores de fármacos y vehículos de suministro, que poseen varias características deseables para este propósito, incluyendo una biocompatibilidad completa, vida útil larga (120 días en los seres humanos) y degradación y eliminación natural por el organismo [1-4]. Poblaciones purificadas de RBC se pueden obtener fácilmente en grandes cantidades y los procedimientos para la encapsulación de fármacos de molécula pequeña o proteínas son sencillos [5]. Como vehículo de suministro, los RBC encapsulados pueden ser modificados de manera eficiente captados por las células del sistema reticuloendotelial (RES), suministrando fármacos anti-inflamatorios, agentes anti-cáncer o antígenos [1]. Alternativamente, los RBC que encapsulan enzimas pueden servir como biorreactores circulantes que pueden detoxificar de forma continua toxinas o metabolitos en exceso presentes en la sangre [4]. En este sentido, los canales y transportadores presentes en la membrana de eritrocitos permiten el transporte de iones, aminoácidos y diversas moléculas pequeñas dentro y fuera de la célula [6]. Es importante destacar que las proteínas encapsuladas consideradas extrañas por el sistema inmunitario están protegidas de cualquier anticuerpo de neutralización presente en la circulación. El proceso de encapsulación implica el hinchamiento hipotónico reversible de los RBC que abre transitoriamente poros en la membrana, lo que permite que los fármacos entren en las células [5, 11]. Tras el regreso al medio isotónico, los poros se cierran y el fármaco está atrapado. Si bien el procedimiento es altamente reproducible, las propiedades inherentes de la proteína encapsulada son críticas, con la eficacia dependiente de la estabilidad y actividad específica de la enzima.

25 **[0013]** Teniendo en cuenta que el concepto básico de la encapsulación de enzimas dentro de RBC (por ejemplo, EP 101 341) hace tiempo que existe, el número de ejemplos y aplicaciones que utilizan este enfoque en los últimos años son relativamente pocos [16]. Una de las aplicaciones más prometedoras y avanzadas ha sido la encapsulación de asparaginasa para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) [17, 18]. Aunque la asparaginasa es ampliamente utilizada para tratar ALL, la enzima tiene una semivida corta en plasma (de 15 a 30 h dependiendo de la fuente bacteriana de la proteína), por lo que se requiere una readministración frecuente y la inducción de respuestas inmunes adversas significativas y toxicidad general. Los ensayos clínicos anteriores y en curso que utilizan RBC cargados con asparaginasa han mostrado una farmacocinética y farmacodinámica ampliamente mejorada en comparación con la enzima libre y redujeron significativamente los efectos inmunes adversos [4, 19-21].

35 **[0014]** El modelo de biorreactor de eritrocitos puede funcionar si están presentes simultáneamente varios requisitos previos, en particular, la enzima es estable y activa dentro de los eritrocitos, los eritrocitos no se degradan por la enzima, y el sustrato para la enzima entra a una velocidad suficiente en los RBC. La situación es mucho más complicada en el caso de PAH que requiere adicionalmente su cofactor BH<sub>4</sub>.

40 **[0015]** En línea con los desarrollos recientes en PAL como enzima de sustitución, el presente solicitante ha encapsulado PAL en RBC y ha observado que los RBC cargados con PAL son capaces de reducir los niveles de Phe en ratones normales (datos no mostrados). Sin embargo, la farmacocinética de PAL-RBC era inusualmente corta, perdiéndose PAL de la circulación en menos de 24 horas. Esto puede explicarse por la muy alta sensibilidad de PAL a la degradación, cuyo inconveniente también está presente con PAH.

45 **[0016]** Para comenzar a desarrollar terapias para FCU, el solicitante, sin embargo, ha evaluado el uso de RBC encapsulado con PAH en ratones. Inesperadamente, una forma procariota, monomérica, de PAH se atrapó en RBC de ratón y demostró que funcionaba como biorreactores metabolizadores de fenilalanina cuando se inyectó en el torrente sanguíneo, los PAH-RBC fueron capaces de captar tanto Phe como el cofactor necesario BH<sub>4</sub> de la circulación y de convertir fenilalanina a tirosina, y, en comparación con la proteína PAH libre, que sobrevivió en la sangre durante menos de una hora, y PAL-RBC, los PAH-RBC persistieron en la circulación y se mantuvieron activos durante al menos 10 días.

55 **[0017]** De este modo, la presente invención se refiere en particular:  
 - un eritrocito (o RBC) que encapsula PAH, especialmente en suspensión en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable;  
 - una composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan PAH en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable;  
 - una composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan PAH en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o prevención de fenilcetonuria (FCU) y/u otras enfermedades que implican un nivel demasiado alto de fenilalanina; el tratamiento o la prevención pueden estar en combinación con una dieta restringida de Phe;  
 - un procedimiento de tratamiento o prevención de fenilcetonuria (FCU) y/u otras enfermedades que implican un nivel demasiado alto de fenilalanina, que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan PAH en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable; el tratamiento o la prevención pueden estar en combinación con una dieta restringida de

Phe.

- 5 **[0018]** La definición de la FCU y los diferentes grados del trastorno es la indicada por la U.S. National Library of Medicine in the Genetics Home Reference (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/phenylketonuria>).
- [0019]** En una realización de la invención, se refiere a la FCU clásica. De este modo, la invención se refiere a esta composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento o la prevención de FCU clásica, o el procedimiento de tratamiento o prevención en beneficio de un paciente que tiene o en contra la FCU clásica.
- 10 **[0020]** En una realización, se refieren a la variante de FCU y/o la hiperfenilalaninemia no FCU. Así, la invención se refiere a esta composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de la variante de FCU y/o la hiperfenilalaninemia no FCU, o el procedimiento de tratamiento o prevención en beneficio de un paciente que tiene o en contra de la variante de FCU y/o la hiperfenilalaninemia no FCU.
- 15 **[0021]** Una dieta restringida de Phe es bien conocida por la persona experta en la técnica. Se conoce como dieta baja en fenilalanina, que significa que la dieta comprende alimentos que no tienen o tienen un bajo contenido de Phe.
- [0022]** Por PAH se pretende especialmente una PAH humana de longitud completa, una PAH humana modificada, tal como la PAH humana doble truncada [22], una forma procariota, monomérica, de PAH, tal como PAH de *C. violaceum*, o cualquier otra PAH de longitud completa o modificada que es capaz de catalizar la hidroxilación de L-fenilalanina a L-tirosina usando el co-factor BH<sub>4</sub> y oxígeno molecular. Cada una de estas PAH indicadas también constituye una realización de la invención.
- 20 **[0023]** Habitualmente, los eritrocitos se encuentran en suspensión en una solución salina farmacéuticamente aceptable. Esta puede ser un medio estándar para los eritrocitos, en particular, una solución de NaCl (preferiblemente de aproximadamente 0,9%) posiblemente con ingredientes adicionales, tales como glucosa, dextrosa, adenina y/o manitol.
- [0024]** En una realización, la solución comprende NaCl, adenina y dextrosa. Por ejemplo, se utiliza el medio AS3.
- 30 **[0025]** En otra realización, la solución comprende NaCl, adenina, glucosa y manitol. Los medios estándar que se pueden utilizar son SAG manitol y ADSol.
- [0026]** La solución puede contener además un conservante, tal como la L-carnitina.
- 35 **[0027]** En una realización, una dosis de la suspensión comprende de 50 a 2000 IU, con preferencia de 100 a 1000 IU de PAH encapsulada. Por definición, una dosis es la cantidad de PAH administrada al paciente en un momento dado.
- [0028]** "Encapsulada" significa que la enzima está contenida dentro de los eritrocitos. Sin embargo, es posible que alguna cantidad menor de PAH se retenga dentro de la pared de los eritrocitos.
- 40 **[0029]** La composición puede estar listo para su uso y tiene un hematocrito adecuado para administración por inyección o por perfusión sin dilución.
- 45 **[0030]** En una realización, la composición está lista para su uso. El hematocrito de la suspensión lista para su uso se encuentra ventajosamente entre aproximadamente 40 y aproximadamente 70%, preferiblemente entre aproximadamente 45 y aproximadamente 55%, y mejor aproximadamente el 50%.
- 50 **[0031]** En otra realización, la composición debe diluirse antes de su uso, por ejemplo, antes de la administración por inyección o por perfusión. En una realización de dicha composición a diluir antes de su uso, el hematocrito antes de la dilución se encuentra entre 60 y 90%, y después de la dilución, la composición lista para su uso es tal como se menciona anteriormente.
- 55 **[0032]** La composición se envasa preferiblemente en un volumen de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml. El envase es preferiblemente en una bolsa de sangre del tipo adecuado para una transfusión de sangre. La totalidad de la cantidad de PAH encapsulada correspondiente a la receta médica está contenida preferiblemente en una bolsa de sangre y similares. También puede estar contenida en varias bolsas de sangre y similares.
- 60 **[0033]** Las técnicas para la encapsulación de principio activo en glóbulos rojos son conocidas y la técnica básica de lisis-resellado, que se prefiere en el presente documento, se describe en las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101, a la que los expertos en la técnica se pueden referir. Según esta técnica, el compartimento primario de un elemento de diálisis (por ejemplo, un tubo de diálisis o un cartucho de diálisis) se alimenta continuamente con una suspensión de glóbulos rojos, mientras que el compartimento secundario contiene una solución acuosa que es hipotónica con respecto a la suspensión de glóbulos rojos, con el fin de efectuar la lisis (lisis reversible) de las glóbulos rojos; a continuación, en una unidad de resellado, el resellado de los glóbulos rojos es inducido en presencia de PAH mediante el aumento de la presión osmótica y/o oncótica y, a continuación, se recoge una suspensión de glóbulos rojos que contienen PAH.
- 65

**[0034]** Entre las variantes descritas hasta ahora, se da preferencia al procedimiento descrito en el documento WO2006/016247, que hace posible de manera eficiente, de forma reproducible, de manera segura y estable encapsular PAH. Este procedimiento comprende las siguientes etapas:

1 - suspensión de un sedimento de glóbulos rojos en una solución isotónica en un nivel de hematocrito mayor que o igual al 60 o 65%, enfriamiento entre +1 y + 8 °C,

2 - medición de la fragilidad osmótica utilizando una muestra de glóbulos rojos de dicho sedimento de glóbulos rojos, siendo posible que las etapas 1 y 2 se lleven a cabo en cualquier orden (incluyendo en paralelo); es preferible preparar la suspensión en 1-, y medir la fragilidad osmótica en una muestra de esta suspensión;

3 - lisis y proceso de internalización de PAH, a una temperatura mantenida constante entre +1 y + 8 °C, que comprende pasar la suspensión de glóbulos rojos en un nivel de hematocrito mayor que o igual al 60 o 65%, y una solución de lisis hipotónica enfriada a entre + 1 y 8 ° C, a través de un cartucho de diálisis; y los parámetros de la lisis se ajustan de acuerdo con la fragilidad osmótica medida anteriormente; preferiblemente, se ajusta el caudal de la suspensión de eritrocitos o la osmolaridad de la solución de lisis; y

4 - proceso de resellado llevado a cabo a una temperatura entre + 30 y + 40 °C, y preferiblemente en presencia de una solución hipertónica.

**[0035]** La "internalización" pretende indicar la penetración de PAH dentro de los glóbulos rojos.

**[0036]** En particular, para la diálisis, el sedimento de glóbulos rojos se suspende en una solución isotónica a un nivel de hematocrito alto, mayor que o igual al 60 o 65%, y preferiblemente mayor que o igual al 70%, y esta suspensión se enfría a entre + 1 y + 8 °C, preferiblemente entre + 2 y 6 °C, habitualmente a aproximadamente + 4 °C. De acuerdo con una realización específica, el nivel de hematocrito está comprendido entre 65% y 80%, preferiblemente entre 70% y 80%.

**[0037]** La fragilidad osmótica se mide ventajosamente en las glóbulos rojos justo antes de la etapa de lisis. Los glóbulos rojos o la suspensión que los contiene están ventajosamente a una temperatura próxima a o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. Según otra característica ventajosa de la invención, la medición de la fragilidad osmótica se explota rápidamente, es decir, el proceso de lisis se lleva a cabo poco después de que se haya tomado la muestra. Preferiblemente, este período de tiempo entre la toma de la muestra y el inicio de la lisis es inferior o igual a 30 minutos, aún más preferiblemente inferior o igual a 25, e incluso inferior o igual a 20 minutos.

**[0038]** En cuanto a la manera en que el proceso de lisis-resellado se lleva a cabo, midiendo y teniendo en cuenta la fragilidad osmótica, los expertos en la técnica pueden referirse a WO2006/016247 para más detalles.

**[0039]** Según una característica de la invención, la composición según la invención comprende, al final del proceso de lisis-resellado, una suspensión de glóbulos rojos con un nivel de hematocrito de entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70%, preferiblemente entre aproximadamente 45% y aproximadamente 55%, mejor aún aproximadamente del 50%. Se envasa preferiblemente en un volumen de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml. El envasado es preferiblemente en una bolsa de sangre, jeringuilla y similares, de un tipo adecuado para la transfusión o la administración de sangre. El hematocrito se puede ajustar para proporcionar una composición lista para su uso o una composición diluida para que sea extemporánea. La cantidad de PAH encapsulada correspondiente a la prescripción médica está preferentemente contenida enteramente en la bolsa de sangre, jeringuilla y similares.

**[0040]** El cofactor BH<sub>4</sub> se puede añadir a la composición farmacéutica. El cofactor se puede añadir antes o poco antes de la administración de la composición.

**[0041]** La composición farmacéutica de acuerdo con la invención que comprende eritrocitos que encapsulan PAH en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en este documento, es para utilizar en el tratamiento o prevención de la fenilcetonuria y/u otras enfermedades que implican un nivel demasiado alto de la fenilalanina, en particular de FCU.

**[0042]** En una realización, la composición es para utilizar en el tratamiento o prevención en un paciente en combinación con una dieta restringida de Phe. Preferiblemente, el paciente ya está en una dieta restringida de Phe.

**[0043]** En otra realización, la composición es para utilizar en el tratamiento o la prevención de un paciente que tiene una forma clásica de FCU o está en riesgo de desarrollar una forma clásica de FCU.

**[0044]** En otra realización, la composición es para utilizar en el tratamiento o la prevención de un paciente en combinación con una dieta restringida de Phe y el paciente tiene una forma clásica de FCU o está en riesgo de desarrollar una forma clásica de FCU. Preferiblemente, el paciente ya está en una dieta restringida de Phe.

**[0045]** En otra realización, la composición es para utilizar en el tratamiento o la prevención en un paciente que tiene una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU o está en riesgo de desarrollar una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU.

- 5 [0046] En todavía otra realización, la composición es para utilizar en el tratamiento o la prevención en un paciente con una dieta restringida de Phe y el paciente tiene una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU o está en riesgo de desarrollar una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU. Preferiblemente, el paciente ya está en una dieta restringida de Phe.
- 10 [0047] Según una característica, la composición es para utilizar en combinación con, o en un paciente que recibe dosis, del cofactor BH<sub>4</sub>. Las modalidades para el tratamiento con el cofactor asociado se describen en el presente documento con respecto al procedimiento de tratamiento.
- 15 [0048] El procedimiento de tratamiento o prevención de la fenilcetonuria y/u otras enfermedades que implican un nivel demasiado alto de fenilalanina, en particular la FCU, comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan PAH en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en el presente documento.
- 20 [0049] En una realización, en este procedimiento, el tratamiento o prevención se combina con una dieta restringida de Phe. Preferiblemente, la administración de la composición según la invención se realiza en un paciente que ya está bajo una dieta restringida de Phe.
- [0050] En otra realización, el tratamiento o prevención se aplica a un paciente que tiene una forma clásica de FCU o que está en riesgo de desarrollar una forma clásica de FCU
- 25 [0051] En otra realización, el tratamiento o la prevención se aplica a un paciente que tiene una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU o que está en riesgo de desarrollar una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU.
- [0052] En otra realización, el tratamiento o prevención se combina con una dieta restringida de Phe y el paciente tiene una forma clásica de FCU o está en riesgo de desarrollar una forma clásica de FCU. Preferiblemente, la administración de la composición según la invención se realiza en un paciente que ya está bajo una dieta restringida de Phe.
- 30 [0053] En aún otra realización, el tratamiento o prevención se combina con una dieta restringida de Phe y el paciente tiene una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU o está en riesgo de desarrollar una variante de FCU y/o hiperfenilalaninemia no FCU. Preferiblemente, la administración de la composición según la invención se realiza en un paciente que ya está bajo una dieta restringida de Phe.
- 35 [0054] La administración se efectúa preferiblemente mediante inyección intravenosa o intraarterial. En una realización conveniente, la administración se lleva a cabo mediante perfusión de una bolsa de sangre o similar. La administración se efectúa habitualmente por vía intravenosa en el brazo o a través de un catéter central. Habitualmente, una dosis se perfunde o infundiona y esto puede durar de aproximadamente 15 a 45 minutos.
- 40 [0055] Según una característica de la invención, se administran de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml, habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 ml de una suspensión de glóbulos rojos. La suspensión está en un nivel de hematocrito adecuado, generalmente se administra entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70%, preferiblemente entre aproximadamente 45% y aproximadamente 55%, mejor aún de aproximadamente el 50%, se administran.
- 45 [0056] Según una característica, se administra una cantidad eficaz del cofactor BH<sub>4</sub> al paciente. Habitualmente, el cofactor se administra diariamente. La administración del cofactor puede comenzar antes, simultáneamente o después de la administración de la composición de la invención. El cofactor se puede administrar al menos durante un período durante el cual el paciente está bajo tratamiento con la composición de la invención. Puede administrarse el paciente con el cofactor diariamente durante toda la vida.
- 50 [0057] El cofactor se puede añadir también a la composición antes de la administración al paciente. Por lo tanto, la composición según la invención puede comprender el cofactor.
- 55 [0058] La invención se describirá a continuación con mayor detalle usando ejemplos tomados como formas de realización y en referencia a las figuras.
- [0058] **Figura 1.** Encapsulación de PAH de *C.violaceum* en glóbulos rojos. A) Transferencia Western para estimar la cantidad de PAH atrapada dentro de los RBC. La mezcla de RBC y PAH antes de la encapsulación (RBC + PAH), día 0 (d0) y día 1 (d1) después de la encapsulación (PAH-RBC), el sobrenadante de la suspensión de PAH-RBC (S), o RBC solos (RBC). Se cargó un equivalente de 5 nl de cada muestra por carril, con la excepción de que la muestra de RBC + PAH se diluyó 0,5X y 0,25X antes de la carga (es decir, un equivalente de 2,5 y 1,25 nl de muestra cargada). La transferencia se sondó con un anticuerpo anti-PAH. B) Actividad enzimática de los PAH-RBC. Se ensayaron 10 µl de PAH-RBCs en el día 0 y día 1.
- 60 [0058] **Figura 2.** Farmacocinética de PAH libre y PAH-RBC después de la administración IV en ratones normales. A) Transferencia Western de sangre entera 15' y 6 h después de la inyección de la enzima PAH libre (4 mg/kg, es decir, 0,1 mg para un ratón de 25 g). Se cargó un equivalente de 0,5 µl de sangre por carril. N = 3 ratones por punto de tiempo. B) Cuantificación de los niveles de PAH en sangre con el tiempo después de la inyección de PAH-
- 65

RBC. Se realizó una transferencia Western de RBC lavados de muestras de sangre tomadas a las 6 h, 1, 3, 6, y 10 días después de la inyección y se cuantificó la señal de PAH por densitometría. La señal se comparó con los patrones de PAH purificada. C) Actividad de la enzima PAH en sangre con el tiempo después de la inyección de PAH-RBC. La actividad de PAH se midió de muestras de sangre entera tomadas a las 6 h, 1, 3, 6, y 10 días después de la inyección. N = 3 ratones por punto de tiempo. Los datos se expresan como la media +/- SEM.

**Figura 3.** Efecto de la administración IV de PAH-RBC sobre los niveles plasmáticos de Phe 6 h después de la inyección de PAH-RBC en ratones normales. BH<sub>4</sub> se inyectó IP o IV (200 mg/kg) 5,5 h después de la inyección de PAH-RBC. N = 3 ratones por grupo. B) Niveles plasmáticos de BH<sub>4</sub> 6 h después de la inyección de PAH-RBC. N = 1 para grupo IV solo. Het, ratones heterocigotos. N = 8 ratones por grupo (N = 3 ratones het sin tratar). \*\* P < 0,001, \* P < 0,01. Los datos se expresan como la media +/- SEM.

## Ejemplos:

### Expresión y purificación de PAH de *C. violaceum* recombinante

**[0059]** La secuencia que codifica PAH de *C. violaceum* PAH (# de acceso GenBank AF6711) se optimizó en codones para la expresión en *E. coli* y se sintetizó mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA, EE.UU.). La secuencia sintética se clonó en los sitios Ndel y XhoI de pET29a (+) (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania) de manera que se añadió una secuencia de 6 etiquetas de His en el marco al extremo 3' del gen de PAH. La construcción pET29a-PAH se utilizó para transformar células estrella BL21 (DE3) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), que fueron inducidas con IPTG 0,5 mM a 20 °C durante 18 h. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, inhibidores de la proteasa). La suspensión celular se sonicó, a continuación, se centrifugó a 17.000 xg durante 30 min. El sobrenadante se decantó y se añadió FeSO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 0,6 mM. El sobrenadante se agitó durante 30 min a 4 °C, a continuación, se filtró a través de un filtro de 0,2 μm.

**[0060]** Se equilibró una columna HisTrap FF de 5 ml (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA EE.UU.) con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, imidazol 5 mM). Después de cargar el sobrenadante, la columna se lavó con 50 CV de tampón Triton X-114 (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, Triton X-114 al 0,1%), seguido por 20 CV de tampón de equilibrado. A continuación, la proteína se eluyó con tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, imidazol 300 mM). Las fracciones que contenían proteína se agruparon, se realizó un intercambio de tampón en acetato de sodio 50 mM, pH 6,2, se concentraron mediante ultrafiltración (columnas Amicon PD-10) (EMD Millipore) y se almacenaron a -20 °C.

### Ensayo de enzima PAH

**[0061]** La actividad de PAH de *C. violaceum* purificada se midió según el procedimiento descrito por Nakata et al. [13] con algunas modificaciones. La mezcla de ensayo contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, DTT 4 mM, L-fenilalanina 4 mM, 100 μg de catalasa bovina, y 10-50 μg de enzima PAH en un volumen de 250 μl. La reacción se inició mediante la adición de DMPH<sub>4</sub> hasta una concentración final de 0,4 mM y se llevó a cabo a 23 °C durante 0,5-1 h con agitación. Para mediciones de la actividad PAH de muestras de sangre, se añadieron 10-20 μl de RBC lavados a la mezcla y el tiempo de reacción aumentó a 2-6 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 250 μl de TCA al 5%. La tirosina se detectó colorimétricamente mediante la adición de 250 μl de 1-nitroso-2-naftol al 0,1% en NaOH 100 mM y 250 μl de HNO<sub>3</sub> al 20% (v/v) con NaNO<sub>2</sub> al 0,05% (p/v). La mezcla se incubó a 55 °C durante 30 min, se enfrió a 25 °C, a continuación se centrifugó 3 min x 5000 rpm. El sobrenadante se transfirió a una microplaca y se leyó a 450 nm. Los valores se compararon con patrones de tirosina (0-280 μM).

### Encapsulación de PAH en RBC

**[0062]** La enzima PAH se cargó en RBC de ratón mediante el procedimiento de diálisis hipotónica reversible utilizando un dializador de fibras huecas AN69 (Gambro, Lyon, Francia), tal como se describe por Dufour et al. [24] con algunas modificaciones. Se centrifugó la sangre entera de ratones OF1 y se separó el plasma. Los RBC se lavaron tres veces con NaCl al 0,9% (v/v). A continuación, se añadió la PAH purificada a los RBC lavados hasta una concentración final de 1 mg/ml, dando lugar a una suspensión celular con un hematocrito de aproximadamente 70%. Los RBC más PAH se dializaron frente a un tampón hipotónico de 40 mOsmol/kg y, a continuación, se resellaron con la adición de una solución hipertónica (10% v/v), tal como se describe anteriormente [25]. A continuación, la suspensión se incubó a 37 °C durante 30 min. Después de lavados finales, el producto final se resuspendió con SAG-Manitol más albúmina de suero bovino al 6% hasta un hematocrito del 50%. El producto se almacenó a 2-8 °C y se inyectó no más de 16 horas después de la preparación.

**[0063]** Como control, los RBC de control procesados (CON-RBC) se prepararon mediante diálisis de RBC, tal como se describe anteriormente, pero sin PAH añadida.

### Estimación de los niveles de PAH en PAH-RBC y en la sangre

5 **[0064]** Se diluyó en serie una alícuota de 5 µl de los PAH-RBC con una solución salina tamponada con fosfato (PBS), de forma que se cargó un equivalente de 5 nl de PAH-RBC en un gel de acrilamida al 4-15% (Bio-Rad, hercules, CA). Después de la electroforesis y la transferencia a nitrocelulosa, la transferencia se sondó con un anticuerpo policlonal de conejo para PAH (dilución 1:10.000 de una solución madre 1 mg/ml). El anticuerpo se generó por inmunización de conejos con la proteína PAH de *C. violaceum* purificada. Se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), seguido de un sustrato quimioluminiscente (sustrato quimioluminiscente de SuperSignal West Pico, Thermo Scientific, Rockford, IL) para detectar las bandas.

10 **[0065]** Para la detección de niveles de PAH en la circulación, se centrifugó la sangre entera para sedimentar los RBC, que se lavaron 2X con PBS. Se cargó un equivalente de 0,5 µl de RBC lavados por carril.

## Ratones

15 **[0066]** Los ratones OF1, de 6-8 semanas de edad, fueron adquiridos de Charles River Laboratories (Lyon, Francia). Los ratones PAH<sup>enu2</sup> fueron adquiridos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y una colonia se mantuvo en casa. Los animales PAH<sup>enu2</sup> fueron atendidos en un centro acreditado AAALAC de acuerdo con las directrices establecidas por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Los animales tuvieron acceso a comida y agua ad libitum.

## 20 Estudios *in vivo*

25 **[0067]** Los PAH-RBC o RBC procesados de control negativo se inyectaron por vía intravenosa (10-12 ml/kg) a través de la vena de la cola. Se inyectó tetrahidrobiopterina por vía intraperitoneal (200 mg/kg) 30 minutos antes del sangrado de los animales. Se recogió sangre bajo anestesia (isoflurano al 3-5%) a través del plexo venoso orbital utilizando tubos microcapilares. Una parte alícuota de la sangre entera se congeló a -80 °C para el análisis de la actividad enzimática. La sangre restante se centrifugó, se recogió el plasma y se congeló a -80 °C. Los RBC sedimentados se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), a continuación, se resuspendieron hasta 50% de hematocrito en PBS y se congelaron a -80 °C.

## 30 Medición de los niveles de fenilalanina y BH<sub>4</sub> en plasma

35 **[0068]** Los niveles de Phe y BH<sub>4</sub> en el plasma se analizaron mediante UPLC-MS/MS, utilizando una UPLC Acquity (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) unido a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 5000 (AB Sciex, Framingham, MA, EE.UU.). La L-fenilalanina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) se utilizó para preparar soluciones patrón y se utilizó L-fenilalanina-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N (Sigma-Aldrich) marcada como patrón interno. El análisis de Phe se llevó a cabo usando una columna Acquity BEH C18 (1,7 mm, 2,1 mm x 50 mm) con separación de gradiente, que incluía un mantenimiento de 0,5 min a 100% (ácido trifluoroacético al 0,5%, ácido heptafluorobutírico al 0,3% en agua), seguido de un gradiente de acetonitrilo del 0-30%. Las transiciones MS/MS fueron: 166,1/120,1 para fenilalanina y 176,1/129,1 para fenilalanina marcada.

40 **[0069]** El BH<sub>4</sub> es muy inestable, por lo tanto, se utilizaron 100 ng/ml de cisteína, ditioeritrolal 0,1% como el tampón diluyente de la muestra para minimizar la oxidación. El análisis de BH<sub>4</sub> se realizó usando un cartucho de columna Phenomenex Luna 3u C18 (2) Mercury 2,0 x 2,0 que se mantuvo a 30 °C. La serie cromatográfica se realizó a 1 ml/min de caudal bajo condiciones isocráticas con una fase móvil que consistía en 1% de acetonitrilo con un 99% de un ácido trifluoroacético al 0,5%, solución de ácido heptafluorobutírico al 0,3% en agua. El tiempo total de ejecución fue de 1 min con un volumen de inyección de 1 µl. La ionización por electrospray (ESI) se llevó a cabo en el modo de ion positivo. El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) de la transición de iones precursor-producto fue de 242,0/166,1. El potencial desagrupación (DP) y la energía de colisión (CE) se optimizaron manualmente a 50 y 25, respectivamente, mientras que el potencial de pulverización de iones y la temperatura se ajustaron a 1500 V y 500 °C.

## 50 Análisis estadístico

55 **[0070]** Los datos se analizaron mediante análisis de una vía de la varianza (ANOVA) seguido de post-test de Bonferroni. La significación estadística se asignó de la siguiente manera: \* indica P < 0,01 y \*\* indica P < 0,001.

## RESULTADOS

### Purificación de PAH de *C. violaceum* recombinante de *E. coli*

60 **[0071]** La secuencia que codifica PAH de *C. violaceum* fue optimizada en codones para la expresión en *E. coli*, se sintetizó y, a continuación, se clonó el gen sintético en el vector de expresión de plásmido inducible pET29a, de manera que se incorporó una etiqueta de 6X His en el extremo C- terminal de la proteína. La expresión de PAH se indujo mediante IPTG y la proteína se purificó a partir del lisado de *E. coli* soluble mediante cromatografía de afinidad sobre una resina de níquel-agarosa. La columna se lavó intensamente con tampón de Triton-X-114 al 0,1% para eliminar la endotoxina. Se obtuvieron aproximadamente 130 mg de proteína de > 90% de pureza a partir de seis litros de cultivo. Los niveles de endotoxinas fueron habitualmente inferiores a 0,5 EU/mg y la actividad específica de la enzima

purificada fue de -0,3 U/mg.

**Estabilidad de PAH purificada *in vitro***

5 [0072] Un requisito previo para la encapsulación de una enzima dentro de los RBC es que la enzima debe ser estable y no sea propensa a la inactivación. La estabilidad de las soluciones de PAH purificada se evaluó *in vitro* mediante la incubación a 4, 23, o 37 °C durante 21 días. La enzima exhibió poca pérdida de actividad durante los primeros 14 días a todas las temperaturas ensayadas, con una disminución moderada de la actividad a 37 °C sólo después de tres semanas de incubación. Por lo tanto, los resultados indicaron que la PAH purificada fue bastante estable con el tiempo

10 *in vitro*.

**Encapsulación de PAH de *C. violaceum* en RBC de ratones**

15 [0073] A continuación, se encapsuló la proteína PAH purificada en RBC normales de ratón mediante diálisis hipotónica reversible y resellado. El procedimiento utiliza un dializador de fibras huecas para interrumpir transitoriamente la membrana de los eritrocitos bajo condiciones controladas de tal manera que la hemólisis es mínima, y es actualmente el único procedimiento que puede procesar un volumen suficiente de sangre para utilizar clínico. Las características hematológicas de un lote representativo se muestran en la Tabla 1. La concentración de hemoglobina corpuscular sólo disminuyó ligeramente en comparación con la concentración antes de la diálisis, lo que indica que la hemoglobina se conservó en gran medida dentro de los RBC cargados con PAH. La baja concentración de hemoglobina extracelular indica que hubo poca hemólisis de PAH-RBC tras el almacenamiento durante la noche a 4 °C. Sólo hubo una disminución gradual de la integridad celular con un almacenamiento más prolongado de hasta siete días (datos no mostrados).

25 Tabla 1. Caracterización hematológica de PAH-RBC

	Día 0		Día 1
	RBC + PAH	PAH – RBC	PAH-RBC
Hematocrito (%)	73,7	49,4	47,3
Volumen globular (µm <sup>3</sup> )	54,4	47,8	46,6
Hemoglobina extracelular (g/dl)	NM*	0,2	1,0
Hemoglobina corpuscular (g/dl)	27,7	23,4	23,5
RBC/ml (x10 <sup>9</sup> )	15,8	12,9	13,2

\*NM = no medido

30 [0074] Para determinar la eficacia de encapsulación y la cantidad encapsulada, la mezcla de RBC y PAH purificada antes de la encapsulación, así como el producto encapsulado final, se analizaron por inmunotransferencia. Se diluyó la mezcla de RBC más PAH antes de la encapsulación 2 y 4 veces antes de cargar la muestra en un gel para evitar la sobresaturación de la señal. Mediante comparación con los patrones de PAH purificada, aproximadamente un cuarto de la PAH inicial fue encapsulado con éxito dentro de los RBC, conteniendo el producto final aproximadamente 0,4 mg de PAH por ml (Fig. 1A). El análisis de PAH-RBCs después de un día de almacenamiento a 4 °C mostró que las células permanecieron intactas con una fuga no detectable de PAH en el sobrenadante. El análisis enzimático de PAH-RBC

35 mostró que la enzima PAH seguía siendo activa después de la encapsulación, sin pérdida de actividad después de un día de almacenamiento a 4 °C (Fig. 1B).

**Farmacocinética de PAH-RBC en ratones normales**

40 [0075] Para determinar la farmacocinética de la PAH encapsulada *in vivo*, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con PAH-RBC a una dosis de 10 ml/kg. Se inyectó una cantidad equivalente de PAH libre en un grupo separado de ratones para la comparación, y se recogió sangre se recogió a 15', 6 horas, 1, 3, 6, y 10 días después de la inyección. Aunque estaban presentes abundantes niveles de PAH en el punto de tiempo 15' en el grupo inyectado con PAH libre, la enzima circulante era indetectable en 6 horas después de la inyección (Fig. 2A). En cambio, los niveles de PAH en la sangre de los ratones inyectados con PAH-RBC disminuyeron durante los primeros pocos días, pero persistieron hasta el día 10 (Fig. 2B). La actividad enzimática de los RBC lavados muestreados en cada punto de tiempo

45 mostró que la actividad de PAH estaba presente durante la duración del estudio (Fig. 2C). Los resultados demuestran que la encapsulación de PAH dentro de los RBC mejoró en gran medida la farmacocinética de la enzima en la circulación.

**Eficacia de PAH-RBC en ratones normales**

50 [0076] A continuación, se cuestionó si PAH-RBC inyectados eran capaces de metabolizar la Phe en la sangre. Los ratones fueron inyectados con PAH-RBC (10 ml/kg) y se midieron los niveles de Phe 6 h después de la inyección. Dado que la PAH requiere el cofactor BH<sub>4</sub> para la actividad enzimática, se inyectó BH<sub>4</sub> por vía intravenosa o por vía

55

intraperitoneal 30 minutos antes del sangrado de los animales. Se eligió el momento de la inyección en base a la semivida corta descrita y el rápido aclarado de BH<sub>4</sub> *in vivo* [14, 15]. La inyección de BH<sub>4</sub> solo dio lugar a una pequeña disminución en los niveles de Phe, posiblemente debido a la activación de la PAH del hígado endógena presente en estos animales normales (Fig. 3A). Los altos niveles de BH<sub>4</sub> estaban presentes en la sangre en el punto de tiempo de 6 h después de inyección IV o inyección IP de BH<sub>4</sub> a las 5,5 h después de la inyección de PAH-RBC (Fig. 3B). La administración de PAH-RBC junto con la inyección IV o IP de BH<sub>4</sub> dio lugar a una disminución sustancial en los niveles de Phe, 59 y 78% respectivamente (P <0,001) (Fig. 3A). Hubo un aumento correspondiente en los niveles de tirosina en plasma en los grupos inyectados con PAH-RBCs (datos no mostrados). Los resultados demostraron que PAH-RBC podían metabolizar eficazmente Phe a tirosina en la sangre y reducir los niveles de Phe en ratones normales.

### Encapsulación de PAH en eritrocitos humanos

**[0077]** El procedimiento descrito en el documento WO-A-2006/016247 se utiliza para producir un lote de eritrocitos que encapsulan la PAH. De acuerdo con la enseñanza del documento WO-A-2006/016247, se considera la fragilidad osmótica y los parámetros de lisis se ajustan en consecuencia (se ajusta caudal de la suspensión de eritrocitos en el cartucho de diálisis). El procedimiento se lleva a cabo posteriormente en conformidad con la prescripción del médico, que tiene en cuenta el peso del paciente y la dosis de PAH a administrar. Las especificaciones del producto final son las siguientes:

- volumen corpuscular medio (MCV): 70-95 fl
- concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC): 23-35 g/dl
- hemoglobina extracelular ≤ 0,2 g/dl de suspensión
- fragilidad osmótica ≤ 6 g/l de NaCl
- PAH extracelular ≤ 2% de la actividad total de la enzima.

**[0078]** Los eritrocitos según la invención pueden ser definidos por una o varias de estas especificaciones, en particular, por la concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC) de 23-35 g/dl.

### REFERENCIAS

#### **[0079]**

1. Muzykantov, VR (2010). *Expert Opin Drug Deliv* 7: 403-427.
2. Magnani, M, Pierige, F, and Rossi, L (2012). *Ther Deliv* 3: 405-414.
3. Godfrin, Y, et al. (2012). *Expert Opin Biol Ther* 12: 127-133.
4. Godfrin, Y, y Bax, BE (2012). *Drugs of the Future* 37: 263-272.
5. Hamidi, M, y Tajerzadeh, H (2003). *Drug Deliv* 10: 9-20.
6. Tunnickliff, G (1994). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 108: 471-478.
7. Scriver, CR, y Kaufman, S (2001). Hyperphenylalanemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. En: Scriver, CR, AL Beaudet, WS Sly and D Valle eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill: New York. Pág. 1667-1724.
8. Blau, N, van Spronsen, FJ, and Levy, HL (2010). *Lancet* 376: 1417-1427.
9. Mitchell, JJ, Trakadis, YJ, y Scriver, CR (2011). *Genet Med* 13: 697-707.
10. van Spronsen, FJ (2010). *Nat Rev Endocrinol* 6: 509-514.
11. Kravtsoff, R et al. (1990). *J Pharm Pharmacol* 42: 473-476.
12. Kaufman, S (1987). *Methods Enzymol* 142: 3-17.
13. Nakata, H, Yamauchi, T, and Fujisawa, H (1979). *J Biol Chem* 254: 1829-1833.
14. Harding, CO, et al. (2004). *Mol Genet Metab* 81: 52-57.
15. Ohashi, A et al. (2012). *Mol Genet Metab* 105: 575-581.
16. Millan, CG et al., (2004). *J Control Release* 95: 27-49.
17. Updike, SJ (1985). *Bibl Haematol*: 65-74.
18. Kwon, YM, et al. (2009). *J Control Release* 139: 182-189.
19. Kravtsoff, R, et al. (1996). *Eur J Clin Pharmacol* 51: 221-225.
20. Kravtsoff, R, et al. (1996). *Eur J Clin Pharmacol* 49: 465-470.
21. Domenech, C, et al. (2011). *Br J Haematol* 153: 58-65.
22. Gamez A. et al., *Molecular Therapy* 2004, vol.9, No.1: 124-129.
23. Sarkissian C. N. et al., *Mol. Gen. And Metab.* 86 (2005) S22-S26
24. Dufour, E, et al. (2012). *Pancreas* 41: 940-948.
25. Bourgeaux, V, et al. (2010). *Transfusion* 50: 2176-2184.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende eritrocitos que encapsulan la fenilalanina hidroxilasa (PAH) en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. Composición, según la reivindicación 1, en la que se formula en un volumen de dosis que comprende de 50 a 2000, preferiblemente de 100 a 1000 UI de PAH.
- 10 3. Composición, según la reivindicación 1 o 2, en la que se formula en un volumen de dosis de 10 a 250 ml.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el hematocrito es de entre el 40 y 70%.
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende el cofactor BH<sub>4</sub>.
- 15 6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizar en el tratamiento o prevención de fenilcetonuria (FCU) en un paciente.
7. Composición para utilizar, según la reivindicación 6, en la que el paciente se somete a una dieta restringida de Phe.
- 20 8. Composición para utilizar, según la reivindicación 6 o 7, en la que el paciente tiene una FCU clásica.
9. Composición para utilizar, según la reivindicación 6 o 7, en la que el paciente tiene una variante de FCU y/o una hiperfenilalaninemia no FCU.
- 25 10. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que el paciente está recibiendo el cofactor BH<sub>4</sub>.
11. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que la composición farmacéutica se administra mediante inyección intravenosa o intra-arterial.
- 30 12. Eritrocito que encapsula fenilalanina hidroxilasa (PAH).
13. Eritrocito, según la reivindicación 12, en suspensión en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

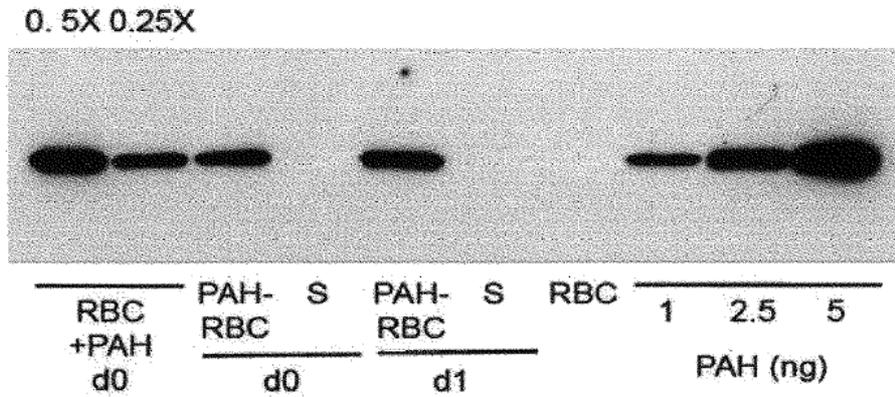


Figura 1A

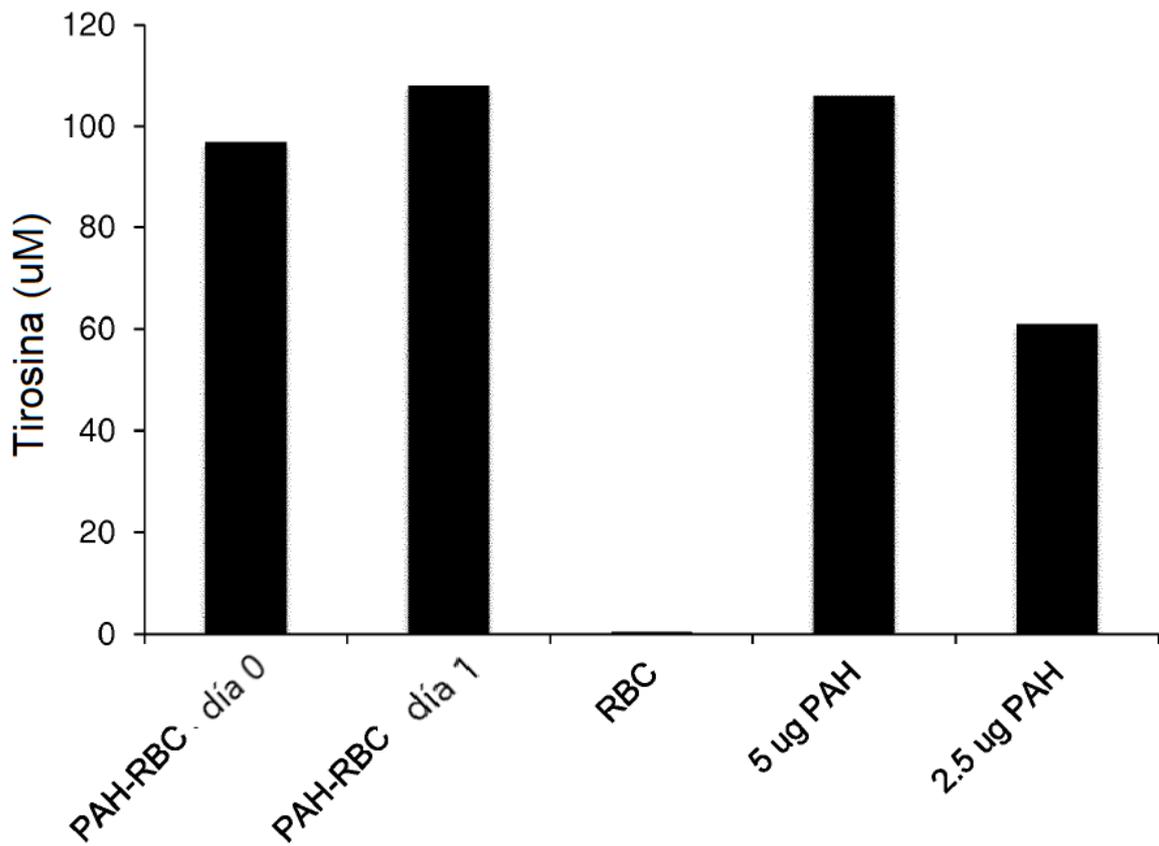


Figura 1B

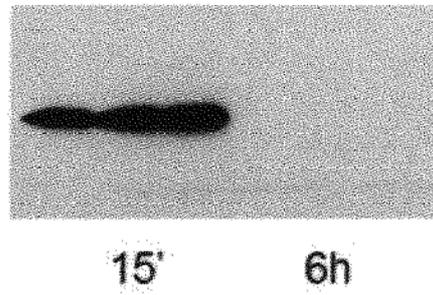


Figura 2A

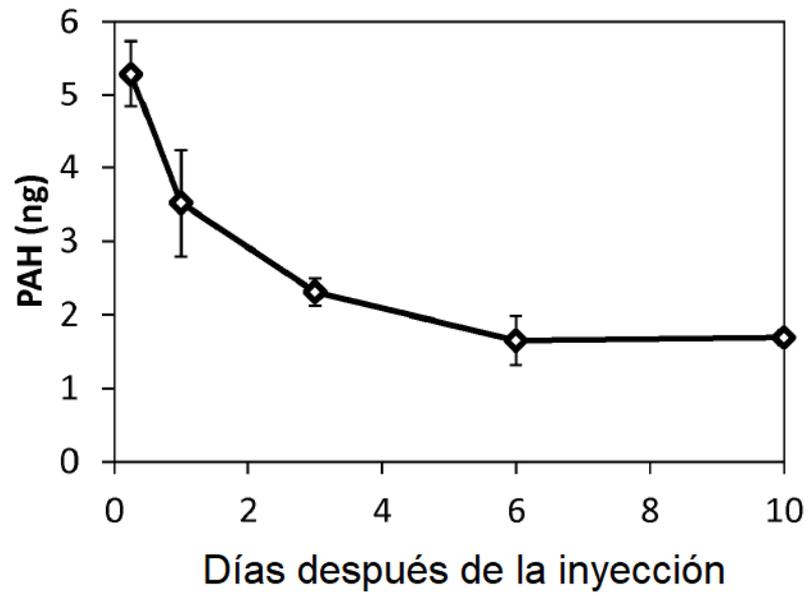


Figura 2B

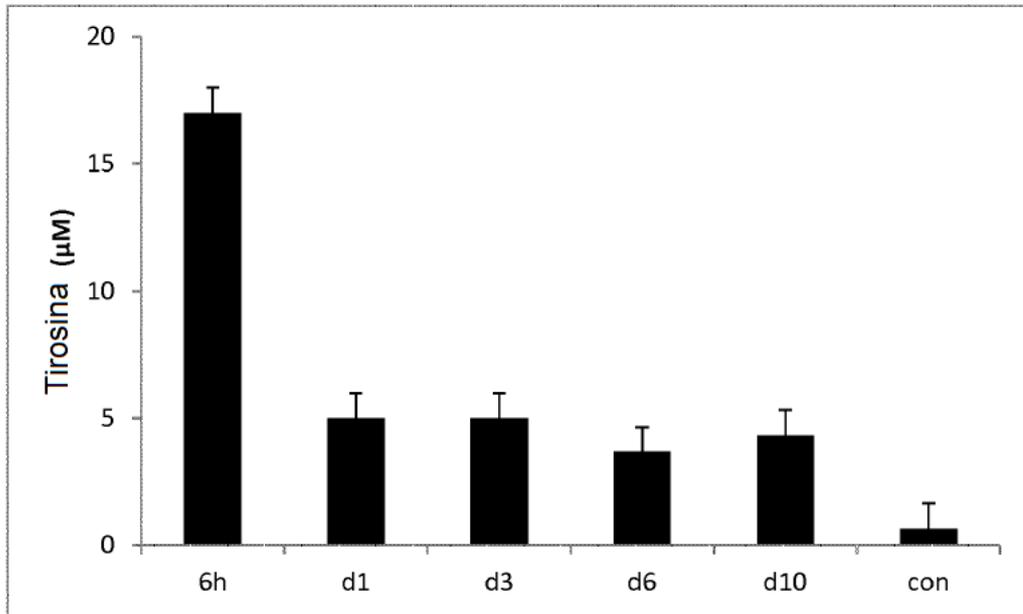


Figura 2C

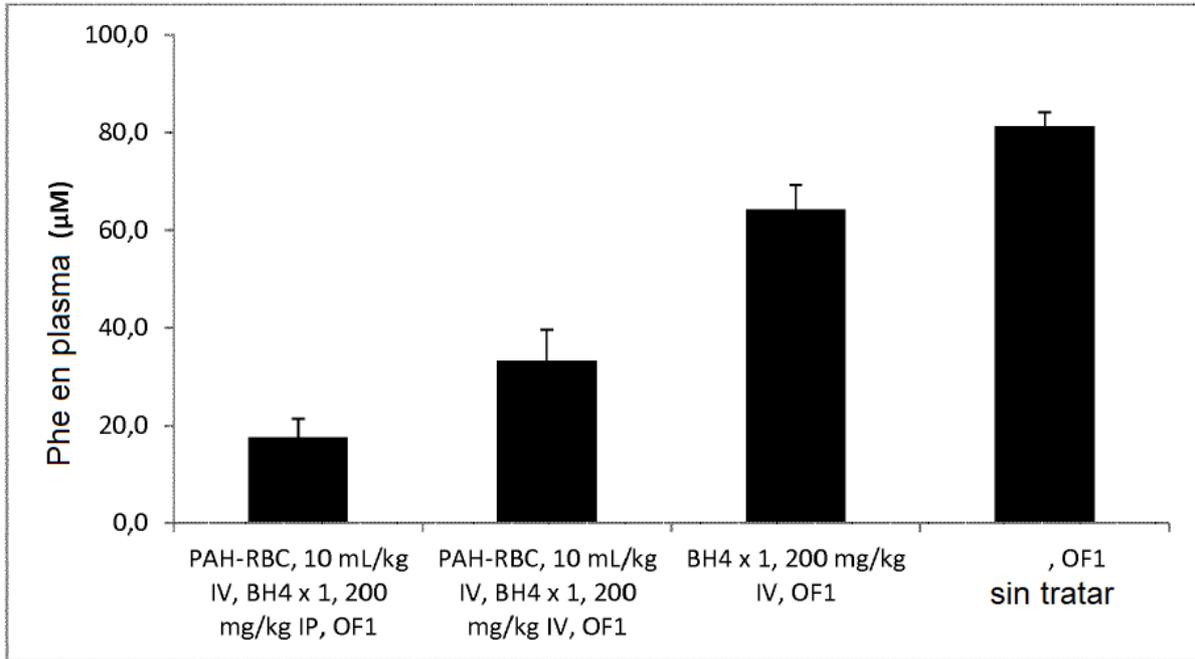


Figura 3A

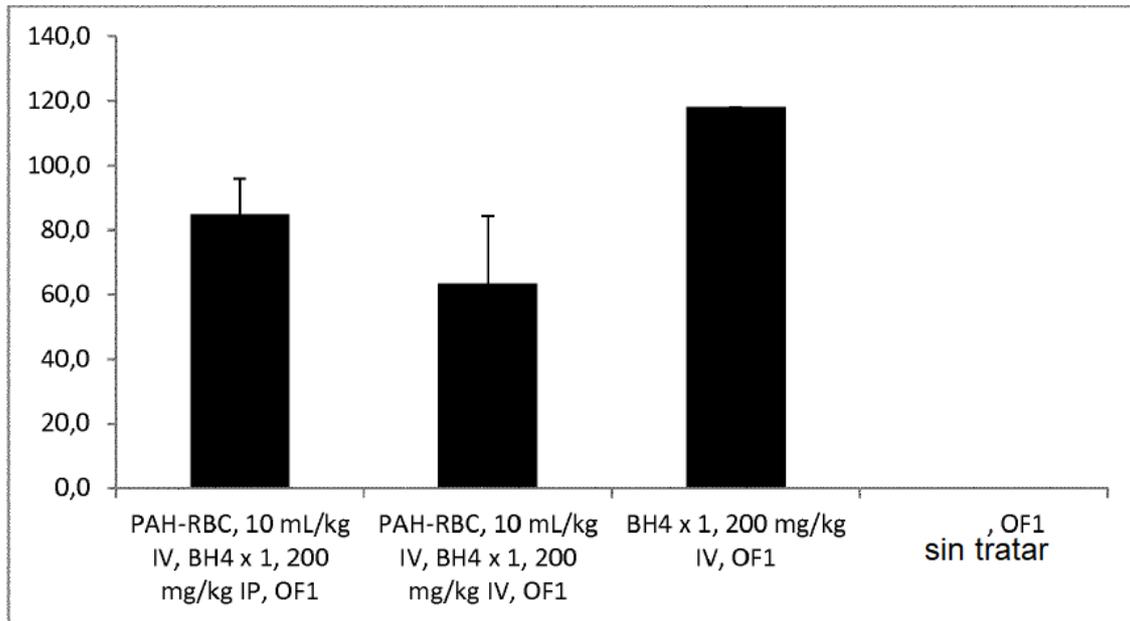


Figura 3B