

**P-12240**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2016/0001106**  
Solicitud de patente a nombre de **ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC., domiciliada en California, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **17951** notificado mediante comunicación electrónica el 27 de diciembre de 2017, relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

## 1. Reivindicaciones

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de 6 reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente. En el nuevo capítulo reivindicatorio se realizaron las siguientes modificaciones:

- 1.1 Como primera medida, se modifica la antigua reivindicación 1 con el fin de no incluir la expresión “*o un fragmento activo, o una variante del mismo*”.
- 1.2 Además, no se incluye la antigua reivindicación 4 y, en consecuencia, se reenumeran las antiguas reivindicaciones 5 a 7 como las reivindicaciones 4 a 6, respectivamente.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad planteadas por el examinador en su concepto técnico.

---

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio no excede 10 reivindicaciones, y es en esencia el mismo objeto, pero definido con mayor claridad.

## 2. Claridad de la solicitud

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

En este sentido, como primera medida, aclaramos que sin estar de acuerdo con la objeción manifestada por el examinador a la expresión “*o un fragmento activo, o una variante del mismo*”, es deseo del solicitante indicar que se ha modificado la reivindicación 1 con el fin de no incluir tal expresión, dando por superada la objeción manifestada. En este sentido, la nueva reivindicación describe “*una glicoproteína recombinante, en donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de 0,7 mol/mol a 1.4 mol/mol de la glicoproteína recombinante, en donde la  $\beta$ -glucuronidasa humana comprende la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 1*”.

Adicionalmente, respecto a la objeción a la antigua reivindicación 4 indicando que esta no es clara debido a que especifica que la expresión “*la concentración media-máxima dependiente de M6P de la glicoproteína recombinante en las células de fibroblasto humanas, es de 1 nM a 5 nM*” corresponde a un resultado a alcanzar que no define la proteína reclamada, sin estar de acuerdo con la propiedad de la objeción manifestada, se indica que no se incluye dicha reivindicación en el presente capítulo reivindicatorio. De esta forma, se da por superada la objeción indicada.

En consecuencia, nos permitimos indicar que el presente capítulo reivindicatorio, que incluye 6 reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

## 3. Descripción

El examinador indica en su concepto técnico que la descripción de la solicitud incluye el término “*siasilados*”, el cual no es conocido en el campo técnico de la invención. A este respecto, es deseo del solicitante indicar que dicho término ha sido corregido en la descripción de la solicitud para indicarlo de manera correcta como “*sialilados*”. El

---

examinador debe notar que el término “*siasilados*” correspondió a un error tipográfico en la traducción de la solicitud. Esto puede ser confirmado al revisar la descripción de la solicitud PCT/US2015/018859 y al considerar que tal término es ampliamente entendido en el estado de la técnica, como se soporta por las referencias al término en varios artículos científicos, como por ejemplo el resumen del documento Bork *et al.*, 2009, *J. Pharm. Sci.* 98(10): 3499-3508 (se presenta como anexo al presente memorial).

Respecto a la objeción a la concentración de azúcar en las páginas 7 y 38, el solicitante ha decidido no incluir las expresiones “*En algunas modalidades, el medio no incluye una cantidad eficaz de un azúcar seleccionado de galactosa, fructosa, n-acetil-manosamina, manosa y combinaciones de estas. Por ejemplo, la cantidad eficaz de un azúcar es mayor que 0,01mM, 0,05mM o 0,1mM*” y “*Por ejemplo, la cantidad eficaz de un azúcar es mayor que 0,01mM, 0,05mM o 0,1mM*” en la descripción con el fin de evitar un malentendido de la invención.

En cuanto a las inconsistencias indicadas por el examinador, se llama la atención del examinador al hecho que se ha modificado el párrafo indicado en la página 68 con el fin de hacer referencia únicamente a la Figura 4. Por otra parte, se ha modificado el párrafo indicado en la página 70 con el fin de hacer referencia a la Figura 3 en lugar de la Figura 4, ya que la Figura 3 es la que ilustra los resultados de la evaluación de la distribución de la proteína objeto de la invención en varios tejidos.

Para mayor entendimiento, se presenta como anexo al presente memorial el capítulo descriptivo que incluye las modificaciones indicadas. Se solicita al examinador que se tengan en cuenta para la evaluación de la solicitud las figuras, secuencias y resumen incluidas en la solicitud originalmente presentada.

De esta forma, nos permitimos indicar que la descripción de la solicitud se ajusta a las disposiciones del artículo 28 de la Decisión 486/00.

#### **4. Patentabilidad**

El examinador indica en su oficio técnico que “*El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 05 de marzo de 2014 y no se encontraron documentos que anticipen el objeto de esta solicitud*”.

De esta forma, es claro que la materia contenida en la presente solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad de un patente de invención, es decir novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, tal como se define en la Decisión 486/00 y como se explica

---

detalladamente en el Manual Andino y la Guía para Examinadores de la Superintendencia de Industria y Comercio.

## 5. Conclusión

Considerando los argumentos indicados anteriormente, respetuosamente se solicita que se reconozca la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial, y, por lo tanto, la Superintendencia de Industria y Comercio conceda el privilegio de patente para la invención titulada “*BETA-GLUCORONIDASAS SLALIDADAS*” a nombre de ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo- y 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: “*Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos*”, (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

---

**6. Anexos**

**6.1** Nuevos capítulos descriptivo y reivindicatorio que incluye 6 reivindicaciones.

**6.2** Copia de documento Bork *et al.*, 2009, *J. Pharm. Sci.* 98(10): 3499-3508.

Señor Director,

  
CAROLINA DAZA MONTALVO  
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle  
TP-141563 CSJ  
[notificaciones@clarkemodet.com.co](mailto:notificaciones@clarkemodet.com.co)

## **Composiciones de glicoproteínas sialiladas**

### **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

5 Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisoria de los EE. UU. Con N.solicitud 61/948,421 presentada el 5 de marzo de 2014 y de la Solicitud Provisoria de los EE. UU. Con N.1 de serie 62/114,313 presentada el 10 de febrero de 2015, cada una de las cuales se ha incorporado  
10 en la presente a modo de referencia en su totalidad para todo fin.

### **CAMPO DE LA INVENCION**

15 La presente invención se relaciona con composiciones de glicoproteínas sialiladas y métodos para su uso en el tratamiento de varios trastornos y afecciones.

### **DESCRIPCIÓN DEL ARCHIVO DE TEXTO PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE**

20

Los contenidos del archivo de texto presentado electrónicamente están incorporados en la presente a modo de referencia en su totalidad: una copia en formato de lectura en computadora del Listado de Secuencias (nombre del archivo:

ULPI\_020\_02WO\_SeqList\_ST25.txt, fecha de registro: 2 de marzo de 2015, tamaño del archivo: 9 kilobytes).

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5

La cantidad de proteínas terapéuticas disponibles en el mercado ha aumentado drásticamente en los últimos años y la mayoría de estas proteínas son glicoproteínas. La presencia de ácido siálico en una glicoproteína puede afectar positivamente la absorción, la semivida en suero y la eliminación del suero, así como también las propiedades físicas, químicas e inmunogénicas de la respectiva glicoproteína. En determinadas circunstancias, por lo tanto, puede ser deseable aumentar el contenido de ácido siálico de una glicoproteína que se quiere utilizar en aplicaciones farmacológicas.

### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

20 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las glicoproteínas recombinantes producidas por células de mamíferos mediante el uso de un medio sin suero/proteínas mejoran la sialilación de la glicoproteína recombinante, por ejemplo, sin reducir el contenido de M6P de

la glicoproteína recombinante.

En algunas modalidades de la presente invención, una composición comprende una glicoproteína recombinante que  
5 tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,05 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,1 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una  
10 composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,7 mol/mol de  
15 la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 1 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que  
20 tiene un contenido de ácido siálico mayor que 1,5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 2 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una

composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que

5 tiene un contenido de ácido siálico mayor que 10 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 20 mol/mol de la glicoproteína recombinante.

10

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, donde al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de los residuos de galactosa de la glicoproteína

15 recombinante se encuentran sialilados.

20

En algunas modalidades la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante.

En algunas otras modalidades la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína

recombinante, donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un nivel elevado de restos de manosa-6-fosfato (M6P).

5

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un nivel elevado de restos de manosa-6-fosfato (M6P) de al menos 10 % en moles del glucano total de la glicoproteína recombinante.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un nivel elevado de restos de manosa-6-fosfato (M6P), por ejemplo, la absorción de K se encuentra en un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o máximo, tal como a partir de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 3 nM cuando se prueba en fibroblastos humanos (MPS7).

En aún otra modalidad, la presente invención proporciona una

composición que comprende una glicoproteína recombinante, donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un alto contenido de  
5 restos de manosa-6-fosfato (M6P), por ejemplo, la mitad del máximo de absorción en fibroblastos humanos, tal como concentraciones en las que la glicoproteína (por ejemplo,  $\beta$ -glucuronidasa humana) alcanza 50 % de la absorción máxima de aproximadamente no más que 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM o 5 nM.

10

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, donde al menos 50 por ciento de la población se encuentra sialilada. En algunas modalidades, la presente  
15 invención proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, donde al menos 60 por ciento de la población se encuentra sialilada. En algunas modalidades, la presente invención proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, donde al menos  
20 70 por ciento de la población se encuentra sialilada. En algunas modalidades, la presente invención proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, donde al menos 80 por ciento de la población se encuentra sialilada. En algunas modalidades, la presente

invención proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, donde al menos 90 por ciento de la población se encuentra sialilada.

5 También se proporciona un método para elaborar una composición/preparación de acuerdo con la presente invención. En algunas modalidades, el método comprende la expresión de la glicoproteína recombinante en un cultivo celular con un medio sin proteínas o suero. En algunas modalidades, un medio  
10 sin proteínas definido desde el punto de vista químico puede utilizarse para cultivar células.

En algunas modalidades, un cultivo celular comprende una célula de mamífero. Los ejemplos de células de mamífero  
15 incluyen, de modo no taxativo, células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, mieloma (por ejemplo, NSO, NSI) o WI38. En una modalidad específica, las células de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO).

20

En algunas otras modalidades, un cultivo celular comprende una célula vegetal. Los ejemplos de células vegetales incluyen, de modo no taxativo, células de zanahoria o cualquier otro cultivo celular a base de células vegetales,

por ejemplo, desarrollado para la producción de proteínas recombinantes.

Adicionalmente se proporciona un método para tratar la  
5 enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD, por sus siglas en inglés) que comprende la administración a un individuo que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/preparación, tal como se describe en la presente. En una modalidad de ejemplo, la  
10 composición/preparación comprende  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante. En una modalidad adicional de ejemplo, las LSD es mucopolisacaridosis tipo 7 (es decir, MPS 7, MPS VII (por sus siglas en inglés) o síndrome de Sly). En algunas modalidades, las  $\beta$ -glucuronidasas humanas recombinantes que  
15 se proporcionan en la presente tienen un aumento en el contenido de ácido siálico y son particularmente útiles en el tratamiento de la LSD, por ejemplo, MPS 7.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un  
20 método para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD) en un sujeto, que comprende la administración de una pauta posológica de la composición/preparación tal como se describe en la presente, donde la administración proporciona un efecto terapéutico

significativo desde el punto de vista estadístico para el tratamiento de las LSD. En una modalidad de ejemplo, la composición/preparación comprende  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante. En una modalidad adicional de ejemplo, la LSD es MPS 7.

### DEFINICIONES

Tal como se utiliza en la presente, el término "eficaz" (por ejemplo, "una cantidad eficaz") significa adecuada para lograr un resultado deseado, esperado o pretendido. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad de un principio activo que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para llevar a cabo tal tratamiento de una afección o enfermedad en particular. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará según, por ejemplo, la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

En general, "tratar" o "tratamiento" de cualquier afección, enfermedad o trastorno hacen referencia, en algunas modalidades, a mejorar la afección, enfermedad o trastorno

(es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En algunas modalidades "tratar" o "tratamiento" hace referencia a la mejora de al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible para el sujeto. En algunas modalidades, "tratar" o "tratamiento" hace referencia a la inhibición de una afección, enfermedad o trastorno, ya sea físico, (por ejemplo, estabilizar un síntoma discernible), fisiológico (por ejemplo, estabilizar un parámetro físico) o ambos. En algunas modalidades, "tratar" o "tratamiento" hace referencia al retraso de la aparición de una afección, enfermedad o trastorno.

Según el antiguo convenio legal de patentes, los términos "un", "una" y "los/as" hacen referencia a "uno o más" cuando se utilizan en esta solicitud, inclusive en las reivindicaciones. El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que hace referencia a alternativas únicamente o a que las alternativas son mutuamente excluyentes. Se contempla específicamente que toda enumeración de elementos que utilice el término "o" significa que cualquiera de estos elementos enumerados también puede excluirse específicamente de la modalidad relacionada.

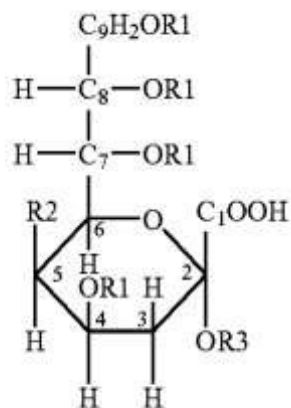
A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se está utilizando para determinar el valor.

Una glicoproteína, tal como se utiliza en la presente, es una proteína que ha sido modificada por la adición de uno o más carbohidratos, inclusive, especialmente, la adición de uno o más residuos de azúcar.

Tal como se utiliza en la presente, "GUS" hace referencia a  $\beta$ -glucuronidasa, una glicoproteína de ejemplo, de acuerdo con la presente invención.

Sialilación, tal como se utiliza en la presente, es la adición de un residuo de ácido siálico a una proteína, que puede ser una glicoproteína. El término "ácido siálico", tal como se utiliza en la presente, abarca una familia de azúcares que contiene 9 o más átomos de carbono, lo que incluye un grupo carboxilo. A continuación se muestra una estructura genérica que abarca todas las formas naturales conocidas de ácido siálico.

5



Los grupos R1 en varias posiciones en una sola molécula  
 10 pueden ser iguales unos a otros o diferentes entre sí. R1  
 puede ser un grupo hidrógeno o acetilo, lactilo, metilo,  
 sulfato, fosfato, anhidro, ácido siálico, fucosa, glucosa o  
 galactosa. R2 puede ser un grupo N-acetilo, N-glicolilo,  
 amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo o N-glicolil-O-metilo.  
 15 R3 representa el residuo anterior de azúcar en un  
 oligosacárido al cual se une el ácido siálico en el contexto  
 de una glicoproteína. R3 puede ser galactosa (conectada en su  
 posición 3, 4 o 5), N-acetil-galactosa (conectada en su  
 posición 6), N-acetil-glucosa (conectada en su posición 4 o  
 20 6), ácido siálico (conectado en su posición 8 o 9) o ácido 5-  
 N-glicolil-neuramínico. Essentials of Glycobiology, Cap. 15,  
 Varki et ál, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva  
 York (1999). Se han encontrado más de 40 formas de ácido  
 siálico en la naturaleza. Essentials of Glycobiology, Cap.

15, Varki et ál, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1999). Una forma común de ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (NANA), en el que R1 es un hidrógeno en todas las posiciones y R2 es un grupo N-acetilo.

5

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una gráfica que compara la farmacocinética de las  $\beta$ -glucuronidasas humanas recombinantes, GUS CR01 en oposición a GUS Lote 43/44 en ratas mediante una infusión de dos etapas. Los datos presentan que la infusión con el CR01 más sialilado tiene como resultado una eliminación menos rápida y una concentración media mayor durante la infusión, que aumenta la exposición total de la enzima, mejorando en forma potencial su penetración en los tejidos que son más difíciles de tratar.

La **Figura 2** es una gráfica que presenta únicamente la fase de eliminación posinfusión de GUS CR01 en oposición a GUS Lote 43/44, que se utilizó para calcular los valores  $t_{1/2}$ . Estas diferencias en la velocidad de eliminación son suficientes para tener como resultado niveles más elevados en suero de enzimas, tal como se muestra en la Figura 1.

La **Figura 3** es una serie de gráficas que presentan los niveles GUS en tejido para el estudio farmacocinético de GUS CR01 en oposición a GUS Lote 43/44. La administración y absorción en tejido de  $\beta$ -glucuronidasas humanas se muestra  
5 mejorado ya que la absorción total de  $\beta$ -glucuronidasas humanas sialiladas (CR01) es mayor en todos los tejidos que la enzima sialilada más baja (43-44). Cuando la actividad de glucuronidasa endógena se resta, la administración eficaz de las  $\beta$ -glucuronidasas humanas terapéuticas aumenta de 2 a casi  
10 10 veces, un descubrimiento sorprendente y excepcional.

La **Figura 4** es una gráfica que muestra la medida de los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG, por sus siglas en inglés) durante 36 semanas en tres sujetos tratados con  $\beta$ -  
15 glucuronidasa humana recombinante (rhGUS, por sus siglas en inglés). Se observó una reducción rápida y sostenida dependiente de la dosis en los niveles de uGAG en los sujetos tratados con rhGUS.

20 La **Figura 5** ilustra la reducción media en los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) al final de cada intervalo de dosificación durante una evaluación de 36 semanas de tres sujetos tratados con rhGUS. Una dosis de 4 mg/kg QOW tuvo como resultado la mayor reducción en los niveles de uGAG.

La **Figura 6** es una gráfica que muestra la medida de los niveles de glicosaminoglicano (GAG, por sus siglas en inglés) en suero durante 36 semanas en tres sujetos tratados con rhGUS. Cada sujeto demostró al menos un 25 % de reducción en los niveles de GAG en suero al final de la pauta terapéutica de 36 semanas.

La **Figura 7** es una gráfica que muestra la medida del tamaño del hígado en sujetos tratados con rhGUS. Se observó una reducción significativa en la hepatomegalia que resulta del protocolo de tratamiento de 36 semanas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las glicoproteínas recombinantes producidas por células de mamíferos mediante el uso de un medio sin suero/proteínas mejora la sialilación de la glicoproteína recombinante y adicionalmente los niveles de los restos de manosa-6-fosfato de la glicoproteína recombinante.

#### ***Composiciones de glicoproteínas sialiladas***

Las composiciones tal como se describe en la presente comprenden una o más glicoproteínas que tienen un nivel elevado o aumentado del contenido de ácido siálico.

Los ácidos siálicos representan una familia de aminoazúcares con 9 carbonos, con más de 50 miembros derivados del ácido N-acetileuramínico. El ácido siálico es solamente uno de los componentes de muchos monosacáridos que construyen glucanos de las glicoproteínas, pero tiene un impacto extraordinario en la calidad y estabilidad de cualquiera de las glicoproteínas terapéuticas por varias razones: (I) los residuos de galactosa de extremos son uno de los mayores factores que determinan la semivida en suero de las glicoproteínas. La semivida en suero se regula mediante la expresión de los receptores de asialoglicoproteínas en el hígado. Estos receptores unen glicoproteínas no sialiladas y se eliminan las asialoglicoproteínas unidas del suero mediante endocitosis. En consecuencia, la expresión del ácido siálico de extremo en los residuos de galactosa impide la degradación de las glicoproteínas en suero; (II) los ácidos siálicos son importantes para proteger epítomos o determinantes antigénicos. Se sabe que los receptores del sistema inmunitario (receptores de linfocitos T y B) frecuentemente prefieren las estructuras no sialiladas. Por lo tanto, la posibilidad de generación de anticuerpos contra

las glicoproteínas terapéuticas se correlaciona con el grado de su sialilación; (III) los ácidos siálicos con carga negativa influyen los parámetros específicos para proteínas, tal como la estabilidad térmica, la resistencia a la degradación proteolítica o su solubilidad (Bork et ál.,  
5 Increasing the Sialylation of Therapeutic Glycoproteins: The potential of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 98, N.º. 10, Octubre de 2009).

10 En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,05 mol/mol, 0,1 mol/mol, 0,5 mol/mol, 0,7 mol/mol, 1 mol/mol, 1,5 mol/mol, 2 mol/mol, 5 mol/mol, 10 mol/mol o 20 mol/mol de la  
15 glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, la invención proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En modalidades adicionales, la invención  
20 proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En determinadas modalidades, la invención proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína que tiene un

contenido de ácido siálico mayor que 1 mol/mol de la glicoproteína recombinante.

En ciertas modalidades, la proteína recombinante es una forma  
5 recombinante de la  $\beta$ -glucuronidasa, una enzima responsable de catalizar la hidrólisis de los residuos del ácido  $\beta$ -D-glucurónico del extremo no reductor de los mucopolisacáridos. En algunas modalidades, la  $\beta$ -glucuronidasa recombinante humana (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico mayor que  
10 0,1 mol/mol, 0,5 mol/mol, 0,7 mol/mol, 1 mol/mol, 1,5 mol/mol, 2 mol/mol o 5 mol/mol de la rhGUS. En una modalidad de ejemplo, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,7 mol/mol de la rhGUS. En otra modalidad de ejemplo, la  $\beta$ -glucuronidasa  
15 humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico mayor que 1,0 mol/mol de la rhGUS. En una modalidad de ejemplo adicional, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,2 mol/mol de la rhGUS.

20

En algunas modalidades, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,5 mol/mol a aproximadamente 2,0 mol/mol de la rhGUS. En una modalidad, la  $\beta$ -glucuronidasa humana

recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,6 mol/mol a aproximadamente 1,5 mol/mol de la rhGUS. En otra modalidad, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,7 mol/mol a aproximadamente 1,4 mol/mol de la rhGUS. En una modalidad ejemplar, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,8 mol/mol a aproximadamente 1,3 mol/mol de la rhGUS. En otra modalidad ejemplar, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,0 mol/mol a aproximadamente 1,2 mol/mol de la rhGUS.

En algunas modalidades, la composición de la presente invención incluye una glicoproteína recombinante, donde al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de los sitios adecuados para el enlace sialilado del ácido siálico. En general, la galactosa constituye el sitio adecuado para el enlace de ácido siálico o sialilación. En determinadas modalidades, una composición comprende una glicoproteína recombinante, donde al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante se encuentran sialilados. En algunas modalidades, la composición comprende

una glicoproteína recombinante, donde al menos el 50 % de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante se encuentran sialilados. En modalidades adicionales, la composición comprende una glicoproteína recombinante, donde  
5 al menos el 60 % de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante se encuentran sialilados. En ciertas modalidades adicionales, la composición comprende una glicoproteína recombinante, donde al menos el 70 % de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante se  
10 encuentran sialilados.

En ciertas modalidades, la glicoproteína recombinante es una  $\beta$ -glucuronidasa recombinante humana (rhGUS). En algunas modalidades, al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o 80 % de los  
15 residuos de galactosa de la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) se encuentran sialilados. En una modalidad de ejemplo, al menos el 50 % de los residuos de galactosa de la rhGUS se encuentran sialilados. En otra modalidad de ejemplo, al menos el 60 % de los residuos de  
20 galactosa de la rhGUS se encuentran sialilados. En otra modalidad de ejemplo adicional, al menos el 70 % de los residuos de galactosa de la rhGUS se encuentran sialilados. En otra modalidad de ejemplo adicional, aproximadamente el 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 % o aproximadamente el 75 % of de los

residuos de galactosa de la rhGUS se encuentran sialilados.

En algunas modalidades, al menos aproximadamente el 40 % de al menos aproximadamente el 90 % de los residuos de galactosa de la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) se encuentran sialilados. En una modalidad, al menos aproximadamente el 50 % hasta al menos aproximadamente el 80 % de los residuos de galactosa de la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) se encuentran sialilados. En otra modalidad, al menos aproximadamente el 60 % hasta al menos aproximadamente el 80 % de los residuos de galactosa de la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) se encuentran sialilados. En otra modalidad de ejemplo, al menos aproximadamente el 65 % hasta al menos aproximadamente el 75 % de los residuos de galactosa de la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) se encuentran sialilados.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un nivel elevado de contenido de ácido siálico así como también un nivel elevado de restos de manosa-6-fosfato (M6P). Tal como se utiliza en la presente, los restos M6P incluyen cualquier manosa-6-fosfato capaz de unirse o ser reconocido por los receptores de M6P inclusive, de modo no taxativo, manosa-6-fosfato mono-fosforilado y bis-fosforilado. En una modalidad,

los restos de M6P incluyen cualquier M6P que se una a un receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPR, por sus siglas en inglés). En otra modalidad, los restos de M6P incluyen cualquier M6P que se una a un receptor de M6P  
5 dependiente de cationes (CD-MPR, por sus siglas en inglés). En aún otra modalidad, los restos de M6P incluyen cualquier M6P bis-fosforilado.

De acuerdo con la presente invención, un nivel elevado de  
10 restos de manosa-6-fosfato puede incluir cualquier nivel de restos de M6P que se considere elevado por el experto en la técnica, por ejemplo, medido utilizando cualquier medio adecuado conocido o que desarrolle posteriormente el experto en la técnica. En una modalidad, un nivel elevado de restos  
15 de M6P de una glicoproteína recombinante incluye niveles de restos de M6P de al menos 10 % en moles, 11 % en moles, 12 % en moles, 13 % en moles, 14 % en moles o 15 % en moles del glucano total de la glicoproteína recombinante. Por ejemplo, la glicoproteína recombinante puede tener un nivel elevado de  
20 M6P como se determina según el porcentaje del área pico de M6P dividido el área pico de glucano total, por ejemplo, al menos 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 %. En algunas modalidades, la glicoproteína recombinante es una  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) y comprende niveles

de restos de M6P de al menos 10 % en moles, 11 % en moles, 12 % en moles, 13 % en moles, 14 % en moles o 15 % en moles del glucano total de la rhGUS. En una modalidad de ejemplo, la rhGUS comprende niveles de restos de M6P de aproximadamente 5 13 % a aproximadamente 15 %.

En otra modalidad, un nivel elevado de restos de M6P de una glicoproteína recombinante incluye un nivel elevado de absorción de la glicoproteína recombinante por parte de las 10 células humanas, por ejemplo, una cantidad de absorción de alta afinidad por parte de fibroblastos humanos. Por ejemplo, la glicoproteína recombinante puede tener una absorción K dependiente de M6P de no más que 1 nM, 1,1 nM, 1,2 nM, 1,3 nM, 1,4 nM, 1,5 nM, 1,6 nM, 1,7 nM, 1,8 nM, 1,9 nM, 2 nM, 2,1 15 nM, 2,2 nM, 2,3 nM, 2,4 nM, 2,5 nM, 2,6 nM, 2,7 nM, 2,8 nM, 2,9 nM, 3 nM, 4 nM, o 5 nM por parte de cualquier célula humana adecuada, por ejemplo, fibroblastos humanos. En algunas modalidades, la glicoproteína recombinante es una  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) y tiene una 20 absorción K dependiente de M6P de menos de 5 nM, de menos de 4 nM, de menos de 3 nM o de menos de 2 nM. En una modalidad de ejemplo, la rhGUS tiene una absorción K dependiente de M6P de aproximadamente 1,2 nM a aproximadamente 1,8 nM.

En aún otra modalidad, un nivel elevado de restos de M6P en una glicoproteína recombinante incluye concentraciones menores necesarias para lograr una absorción máxima de la glicoproteína recombinante por parte de células humanas, por ejemplo, una concentración media-máxima menor. Por ejemplo, la glicoproteína recombinante puede lograr una absorción máxima por parte de las células humanas, por ejemplo, fibroblastos, a una concentración menor que 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM. En algunas modalidades, la glicoproteína recombinante es una  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) que puede lograr una absorción máxima por parte de células humanas, por ejemplo, fibroblastos a concentraciones de menos de 5 nM, de menos de 4 nM, de menos de 3 nM o de menos de 2 nM. En una modalidad de ejemplo, la rhGUS puede lograr una absorción máxima por parte de células humanas, por ejemplo, fibroblastos, a concentraciones de aproximadamente 1,2 nM hasta aproximadamente 1,8 nM.

En aún otra modalidad, un nivel elevado de restos de M6P en una glicoproteína recombinante incluye uno o más niveles de restos de M6P que corresponden a los niveles de restos de M6P relacionados con el contenido de sialilación natural de la glicoproteína recombinante, por ejemplo, el contenido de sialilación de la glicoproteína recombinante antes de

cualquier medio de mejora, tal como el uso de los métodos descritos en la presente solicitud.

De acuerdo con la presente invención, en algunas modalidades la glicoproteína recombinante, por ejemplo, una  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante, o cualquier otra enzima lisosómica, tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un nivel elevado de restos de M6P de al menos 10 % en moles, 11 % en moles, 12 % en moles, 13 % en moles, 14 % en moles o 15 % en moles del glucano total de la glicoproteína recombinante. En una modalidad, la glicoproteína recombinante, por ejemplo, una  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante, o cualquier otra enzima lisosómica, tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un nivel elevado de restos de M6P con una absorción de al menos 1 nM, 1,1 nM, 1,2 nM, 1,3 nM, 1,4 nM, 1,5 nM, 1,6 nM, 1,7 nM, 1,8 nM, 1,9 nM o 2 nM por parte de las células humanas, por ejemplo, fibroblastos humanos. En otra modalidad, la glicoproteína recombinante, por ejemplo, una  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante, o cualquier otra enzima lisosómica, tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un nivel elevado de restos de M6P con una absorción máxima por parte de las células humanas, por ejemplo, fibroblastos humanos, de al menos 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4

nM, 3 nM o 2 nM o 1 nM de la glicoproteína recombinante.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una población de glicoproteínas recombinantes, donde al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la población se encuentra sialilada. En una modalidad, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la población es glicoproteína recombinante de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, con respecto al contenido de sialilación y el nivel de M6P.

La glicoproteína recombinante proporcionada por la presente invención puede ser cualquier glicoproteína. Los ejemplos de glicoproteínas recombinantes incluyen aquellas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares a todas o parte de una de las siguientes proteínas: un ligando Flt3 (tal como se describe en WO 94/28391), un ligando CD40 (tal como se describe en la patente estadounidense N.º 6,087,329), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, leptina, IL-2, angiopoyetina-2 (tal como se describe en Maisonpierre et ál. (1997), Science 277(5322):55-60, que se incorpora a la presente mediante esta referencia), el ligando Fas, el ligando para el activador receptor de NF-kappa B (RANKL, tal como se describe en WO

01/36637), el ligando que induce la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) (TRAIL, como se describe en WO 97/01633), linfopoyetina estromal tímica, el factor de estimulación de colonias de granulocitos, el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, tal como se describe en la patente australiana n.º 588819), el factor de crecimiento de mastocitos, el factor de crecimiento de células madre (se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,204,363, que se incorpora a la presente mediante esta referencia), el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de queratinocitos, el factor de desarrollo y crecimiento de megacariocitos, RANTES, hormonas de crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento similares a la insulina, la hormona paratiroidea, interferones que incluyen interferones  $\alpha$ , interferones  $\gamma$  e interferones de consenso (tal como los que se describen en las patentes estadounidenses n.º 4,695,623 y 4,897,471, ambas se incorporan a la presente mediante esta referencia), el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofin-3, glucagón, interleucinas 1 a 18, factores de estimulación de colonias, linfoxina- $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF), factor de inhibición de leucemia,

oncostatin-M y varios ligandos para las moléculas de superficie celular ELK y Hek (tales como ligandos para cinasas relacionadas con eph o LERKS). Pueden encontrarse descripciones de proteínas que pueden producirse de acuerdo con los métodos inventivos, por ejemplo en *Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, Vol. II* (Aggarwal y Gutterman, ed. Blackwell Sciences, Cambridge, Mass., 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay y Leigh, eds., Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993); y *The Cytokine Handbook* (A. W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1991), todos los cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia.

Las glicoproteínas recombinantes de la presente invención pueden incluir cualquier enzima lisosómica, especialmente toda enzima útil para el tratamiento de remplazo de enzimas (ERT, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de tales enzimas incluyen, de modo no taxativo, alfa glucosidasa ácido, beta-glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa, alfa-Galactosidasa A, beta-galactosidasa ácida, beta-hexosaminidasa A, beta-hexosaminidasa B, esfingomielinasa ácida, galactocerebrosidasa, ceramidasa ácida, arilsulfatasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan N-sulfatasa, alfa-N-Acetilglucosaminidasa, Acetil-CoA, alfa-

glucosaminida N-acetiltransferasa, N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, N-Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa ácida, Arilsulfatasa B, alfa-manosidasa ácida, beta-manosidasa ácida, alfa-L-fucosidasa ácida, sialidasea y alfa-N-acetilgalactosaminidasa.

En determinadas modalidades de ejemplo, la glicoproteína recombinante de la presente invención es  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS). La  $\beta$ -glucuronidasa humana es una glicoproteína que contiene hasta 16 oligosacáridos por molécula, inclusive una variedad de cadenas que son de los tipos de manosa elevada, complejo e híbrido.

En la presente también se describen polipéptidos de glicoproteína aislados o purificados. Por ejemplo, en la presente se describen polipéptidos de la rhGUS aislados o purificados. Los polipéptidos de la rhGUS aislados o purificados pueden utilizarse en una o más de las composiciones o métodos que se describen en la presente.

20

Los polipéptidos de la rhGUS pueden incluir la secuencia de polipéptidos de la rhGUS así como también fragmentos de la misma, variaciones naturales de la misma y variaciones no naturales de la misma. La secuencia de la rhGUS se

proporciona en la ID de SEC. N.º: 1. En la presente se describen polipéptidos aislados o purificados que consisten de la ID de SEC. N.º: 1. En la presente también se describen polipéptidos aislados o purificados que comprenden la ID de SEC. N.º: 1, así como también fragmentos de la misma. Los fragmentos pueden ser al menos aproximadamente 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 o 500 o más aminoácidos contiguos. En la presente también se describen polinucleótidos aislados o purificados que consisten de o comprenden una secuencia de polinucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos de la ID de SEC N.º: 1.

En algunas modalidades, el polipéptido de la rhGUS tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,1 mol/mol, 0,5 mol/mol, 0,7 mol/mol, 1 mol/mol, 1,5 mol/mol, 2 mol/mol o 5 mol/mol del polipéptido de la rhGUS. En algunas modalidades, el polipéptido de la rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,5 mol/mol a aproximadamente 2,0 mol/mol del polipéptido de la rhGUS. En una modalidad, el polipéptido de la rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,6 mol/mol a aproximadamente 1,5 mol/mol del polipéptido de la rhGUS. En otra modalidad, el polipéptido de la rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,7 mol/mol a aproximadamente 1,4 mol/mol

del polipéptido de la rhGUS. En una modalidad de ejemplo, el polipéptido de la rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,8 mol/mol a aproximadamente 1,3 mol/mol del polipéptido de la rhGUS. En otra modalidad ejemplar, la  
5 rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,0 mol/mol a aproximadamente 1,2 mol/mol del polipéptido de la rhGUS.

En modalidades adicionales, al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70  
10 % o 80 % de los residuos de galactosa del polipéptido de la rhGUS se encuentran sialilados. En una modalidad de ejemplo, al menos aproximadamente el 65 % hasta aproximadamente el 75 % de los residuos de galactosa del polipéptido de la rhGUS se encuentran sialilados.

15

Como se describe en la presente, las glicoproteínas de la invención pueden producirse de forma recombinante. Un polinucleótido que codifica una glicoproteína recombinante de la invención puede ser introducido en un vector de expresión  
20 recombinante. En una modalidad de ejemplo, la glicoproteína recombinante es la rhGUS. En consecuencia, la aplicación también se relaciona con un vector de expresión recombinante que comprende el polinucleótido que codifica la rhGUS. En una modalidad, la proteína rhGUS producida por el vector de

expresión recombinante consiste de o comprende la ID. de SEC.  
N.º: 1.

Tal como se entiende en la técnica, los vectores  
5 recombinantes pueden expresarse en un sistema de células  
huésped adecuado utilizando técnicas conocidas en la técnica.  
En consecuencia, la aplicación también se relaciona con una  
célula huésped que comprende un polinucléotido que codifica  
la rhGUS. En una modalidad, la proteína rhGUS producida por  
10 la célula huésped comprende la ID de SEC. N.º.: 1. Las  
células huésped adecuadas para expresar la proteína rhGUS de  
la presente invención pueden incluir cualquier línea celular  
que pueda glicosilar proteínas, preferentemente una línea  
celular de mamífero que haya sido diseñada con ingeniería  
15 genética para que exprese una proteína. Por ejemplo, pueden  
utilizarse las células de ovario de hámster chino (CHO),  
HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, de mieloma (por  
ejemplo, NSO, NSI), o las células WI38. En una modalidad de  
ejemplo, las células utilizadas para producir la  
20 glicoproteína recombinante son las células de ovario de  
hámster chino (CHO).

En otro aspecto, la invención proporciona una formulación que  
comprende una o más glicoproteínas que tienen un nivel  
elevado o mayor contenido de ácido siálico. Las formulaciones

en general incluyen formas líquidas (soluciones) como, entre otras, liofilizados reconstituidos, y formas sólidas como, por ejemplo, formas liofilizadas, geles, partículas microencapsuladas y pastas. Las formulaciones, de acuerdo con  
5 algunas de las modalidades de la presente invención, pueden ser combinaciones de formulaciones líquidas, liofilizadas y soluciones líquidas preparadas a partir de liofilizados reconstituidos utilizadas en combinación con geles, partículas y pastas.

10

En algunas modalidades, la formulación es una solución que incluye una solución amortiguadora acuosa y la glicoproteína recombinante. La solución amortiguadora puede incluir fosfato de sodio (Na-Pi), histidina, arginina, glicilglicina, ácido  
15 tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido aspártico, ácido succínico o cualquier combinación de los mismos. En una modalidad de ejemplo, la solución amortiguadora incluye Na-Pi e histidina. En otra modalidad, la solución amortiguadora incluye na-Pi, histidina y arginina.

20

En algunas modalidades, la solución amortiguadora incluye uno o más ingredientes, como, entre otros, cloruro de sodio (NaCl), polioxietileno (Tween-20), cloruro de potasio y sorbitol (por ejemplo, D-sorbitol). En una modalidad de

ejemplo, la solución amortiguadora incluye Na-Pi, histidina, NaCl y Tween 20.

Como es bien sabido en la técnica, la estabilidad de las proteínas puede depender del pH y/o de la fuerza iónica de una formulación. Conforme a algunas modalidades de la presente invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 5,0, por ejemplo, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 6,0. En algunas modalidades, el pH es de aproximadamente 9,0, de aproximadamente 8,0, de aproximadamente 7,5, de aproximadamente 7,0, de aproximadamente 6,5, de aproximadamente 6,0, de aproximadamente 5,5 o de aproximadamente 5,0. La presente invención fue la primera que reconoció que reducir el pH de una formulación mejoraría la estabilidad de la glicoproteína recombinante. Por ejemplo, la Tabla 6 en el Ejemplo 2 demuestra la mejoría en la estabilidad medida según el porcentaje de tetrámeros cuando el pH se cambió de 7,5 a 6,0.

20

### **Métodos de producción**

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la sialilación de una glicoproteína y

adicionalmente el nivel de M6P de una glicoproteína producida por un cultivo celular con un medio sin proteínas o suero.

En general, el medio de cultivo puede dividirse en varios subconjuntos según el nivel de medio definido. Por ejemplo, un medio de cultivo puede ser: 1) Medio que contiene suero (normalmente de suero fetal bovino (FBS) al 10-20 % ); 2) medio con poco suero (normalmente FBS al 1-5 % ); 3) medio sin suero (sinónimo de medio definido); 4) medio sin proteínas (sin proteínas pero contiene péptido no definidos de hidrolisatos vegetales); 5) medio definido químicamente (solo con proteínas recombinantes y/u hormonas); 6) medio definido químicamente sin proteínas (contiene solo constituyentes de bajo peso molecular, pero puede contener péptidos/hormonas sintéticas); y 7) medio definido químicamente sin proteínas y sin péptidos (contiene solo constituyentes de bajo peso molecular).

En algunas modalidades de la presente invención, un medio con poco suero puede utilizarse para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunas modalidades de la presente invención, un medio sin suero puede utilizarse para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunas modalidades, un medio sin proteínas puede utilizarse

para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunas modalidades, un medio definido químicamente puede utilizarse para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunas modalidades, un medio definido químicamente sin proteínas puede utilizarse para cultivar células como se demuestra en el Ejemplo 1. Adicionalmente en algunas otras modalidades, un medio definido químicamente sin proteínas y sin péptidos se utiliza para cultivar células para la expresión de glicoproteínas.

10

Tal como se entiende en la técnica, el medio sin suero puede contener productos no definidos derivados de animales, tales como albúmina de suero (purificada de la sangre), hidrolisatos, factores de crecimiento, hormonas, proteínas portadoras y factores de unión. Estos productos no definidos derivados de animales contendrán contaminantes complejos, tal como el contenido lipídico de la albúmina. En oposición, el medio químicamente definido se define como todos los componentes que se identifican y que tienen concentraciones exactas conocidas. En algunas modalidades, un medio químicamente definido carece totalmente de componentes derivados de animales. En algunas modalidades, un medio químicamente definido excluye el FBS, la albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), la albúmina de suero

20

humano (HAS, por sus siglas en inglés) o combinaciones de estos. Para lograr esto, el medio químicamente definido se complementa normalmente con versiones recombinantes de albúmina y factores de crecimiento, normalmente derivados de arroz o *E. coli*, o químicos sintéticos tales como el polímero alcohol polivinílico que puede reproducir algunas de las funciones de BSA/HSA.

En algunas modalidades, el medio sin proteínas descrito en la presente no contiene proteínas o componentes de origen biológico. La ausencia de proteínas en el medio elimina el riesgo de contaminación con patógenos por transmisión sanguínea u otros o proteínas no humanas. Además, tales medios sin proteínas normalmente se encuentran completamente definidos en cuanto a identidad y cantidad de todos sus ingredientes, que puede proporcionar una consistencia del producto sin comparación, un perfil de control de calidad superior del producto y mejor estabilidad del producto que los medios que contienen proteínas

20

En algunas modalidades, el medio utilizado en la presente no incluye una cantidad eficaz de un azúcar seleccionado de galactosa, fructosa, n-acetil-manosamina, manosa y combinaciones de estas.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para cultivar células de mamífero que comprende el crecimiento en cultivo de células de mamífero para producir  
5 una proteína, por ejemplo, una glicoproteína, en un medio sin proteínas o suero. Las células adecuadas para la práctica de la presente invención incluyen cualquier línea celular que pueda glicosilar proteínas, preferentemente una línea celular de mamífero que haya sido modificada genéticamente para  
10 expresar una proteína. En algunas modalidades, las células son líneas celulares homogéneas. Se conocen en la técnica numerosas líneas celulares adecuadas. Por ejemplo, pueden utilizarse células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, mieloma (por ejemplo, NSO,  
15 NSI) o WI38. En una modalidad de ejemplo, las células utilizadas para producir la glicoproteína recombinante son células de ovario de hámster chino (CHO).

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención,  
20 son particularmente útiles las células CHO, que son ampliamente conocidas por la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, citocinas, factores de coagulación y anticuerpos (Brasel et ál. (1996), Blood 88: 2004-2012; Kaufman et ál. (1988), J. Biol Chem 263:6352-6362;

McKinnon et ál. (1991), J Mol Endocrinol 6: 231-239; Wood et ál. (1990), J. Immunol 145: 3011-3016). Una línea celular mutante que carece de dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub et ál. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77:4216-4220), tal como DXB11 o DG-44, es útil dado que el sistema de expresión génica amplificable y seleccionable eficiente de DHFR permite un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes en estas células (Kaufman (1990), Meth. Enzymol. 185: 527-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o de suspensión y exhiben una estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y las proteínas recombinantes expresadas en ellas han sido ampliamente caracterizadas y aprobadas para su uso en la elaboración clínica comercial por los organismos reguladores.

15

En algunas modalidades, las células se cultivan en un modo de lote alimentado. Un proceso con lote alimentado se define como una técnica operativa en la que uno o más nutrientes (sustratos) se agregan a un medio de cultivo para aumentar el crecimiento y lograr una alta densidad de células en un biorreactor. Por lo general, la suma de nutrientes en una cantidad controlada tiene un efecto positivo en la velocidad de crecimiento del cultivo y la producción. En algunas modalidades, puede lograrse una concentración celular mayor

20

que  $10^6$  células/mL,  $10^7$  células/mL,  $2 \times 10^7$  células/mL,  $5 \times 10^7$  células/mL o  $10^8$  células/mL en biorreactores. En algunas modalidades, los biorreactores que se utilizan en el modo de lote alimentado tienen un volumen de al menos 10L, 20L, 50L, 80L, 100L, 250L, 500L o 1000L. Las células pueden cultivarse ya sea en cultivos de suspensión o adherentes. En una modalidad de ejemplo, las células se cultivan en suspensión. Se prefieren las células de mamífero y en una modalidad de ejemplo particular, las células de mamífero son células de ovario de hámster chino.

### ***Tratamiento terapéutico***

En aún otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección o trastorno que comprende la administración a un individuo que necesita tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/preparación, tal como se describe en la presente.

Las composiciones/preparaciones que se describen en la presente pueden utilizarse solas o junto con cualquier agente/composiciones terapéuticas para varios fines, tales como en los métodos de tratamiento descritos en la presente. Respecto a esto, las composiciones/preparaciones pueden ser

farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, la afección o trastorno que necesita tratamiento se relaciona con una deficiencia enzimática. Las  
5 deficiencias enzimáticas en los compartimientos celulares tales como el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y el lisosoma causan una amplia variedad de enfermedades en los seres humanos. Por ejemplo, la lisil hidroxilasa, una enzima que normalmente se encuentra en el lumen del retículo  
10 endoplasmático, es necesaria para un procesamiento adecuado del colágeno; la ausencia de la enzima causa síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI, un trastorno grave del tejido conjuntivo. GnT II, que se encuentra normalmente en el aparato de Golgi, es necesario para una glicosilación normal  
15 de proteínas; la ausencia de GnT II conduce a defectos en el desarrollo cerebral.

En una modalidad de ejemplo, la afección o trastorno que se relaciona con una deficiencia enzimática es una enfermedad de  
20 almacenamiento lisosómico (LSD). Más de cuarenta enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) son causadas, directa o indirectamente, por la ausencia de una o más proteínas en el lisosoma. Las LSD surgen del metabolismo anómalo de varios sustratos, lo que incluye glicoesfingolípidos, glucógenos,

mucopolisacáridos y glicoproteínas. El metabolismo de los sustratos se da normalmente en el lisosoma y el proceso se regula en un proceso paso a paso mediante varias enzimas degradativas. Por lo tanto, una deficiencia en cualquier actividad enzimática puede alterar el proceso entero y tener como resultado la acumulación de sustratos particulares. A continuación se enumeran una cantidad de enfermedades de almacenamiento lisosómico y las correspondientes enzimas que fallan:

- 10 Enfermedad de Pompe: Alfa glucosidasa ácida
- Enfermedad de Gaucher: Beta glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa
- Enfermedad de Fabry: alfa galactosidasa A
- Gangliosidosis GMI: Beta-galactosidasa ácida
- 15 Enfermedad de Tay-Sachs: beta-hexosaminidasa A
- Enfermedad de Sandhoff: beta-hexosaminidasa B
- Enfermedad de Niemann-Pick: Esfingomielinasa ácida
- Enfermedad de Krabbe: Galactocerebrosidasa
- Enfermedad de Farber: Ceramidasa ácida
- 20 Leucodistrofia metacromática: Arilsulfatasa A
- Síndrome de Hurler-Scheie: alfa-L-Iduronidasa
- Síndrome de Hunter: iduronato-2-sulfatasa
- Síndrome de Sanfilippo A: Heparan N-sulfatasa
- Síndrome de Sanfilippo B: alfa-N-Acetilglucosaminidasa

Síndrome de Sanfilippo C: Acetil-CoA: alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa

Síndrome de Sanfilippo D: N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa

5 Síndrome de Morquio A: N-Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa

Síndrome de Morquio B: Beta-galactosidasa ácida

Síndrome de Maroteaux-Lamy: Arilsulfatasa B

Síndrome de Sly: beta-Glucuronidasa

10 alfa-Manosidosis: Alfa-manosidasa ácida

beta-Manosidosis: beta-manosidasa ácida

Fucosidosis: Alfa-L-fucosidasa

Sialidosis: Sialidasa

Enfermedad de Schindler-Kanzaki: alfa-N-  
15 acetilgalactosaminidasa

En determinadas modalidades de ejemplo, la presente invención proporciona un método para tratar una LSD que comprende la administración a un individuo que necesita tal tratamiento de  
20 una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/preparación, tal como se describe en la presente. En una modalidad de ejemplo, la composición/preparación comprende  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante. En otra modalidad de ejemplo, la LSD es mucopolisacaridosis tipo 7

(es decir, MPS 7, MPS VII o síndrome de Sly), un trastorno que resulta de la deficiencia de la  $\beta$ -glucuronidasa. En algunas modalidades, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante posee un aumento en el contenido de ácido siálico y es particularmente útil en el tratamiento de una LSD, por ejemplo, MPS 7.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de una afección o trastorno, que comprende la administración de una pauta posológica de una composición/preparación tal como se describe en la presente, donde la administración proporciona un efecto terapéutico significativo desde el punto de vista estadístico para el tratamiento de la afección o trastorno. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, la composición/preparación comprende una glicoproteína recombinante que posee un aumento en el contenido de ácido siálico. En una modalidad de ejemplo, la glicoproteína recombinante tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En otra modalidad de ejemplo, la glicoproteína recombinante tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunas modalidades, la afección o trastorno se relaciona con una deficiencia enzimática. En una modalidad de ejemplo, la afección o

trastorno que se relaciona con una deficiencia enzimática es una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD).

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método  
5 para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento  
lisosómico (LSD) en un sujeto, que comprende la  
administración de una pauta posológica de la  
composición/preparación tal como se describe en la presente,  
donde la administración proporciona un efecto terapéutico  
10 significativo desde el punto de vista estadístico para el  
tratamiento de las LSD. En una modalidad de ejemplo, la  
composición/preparación comprende una  $\beta$ -glucuronidasa humana  
recombinante que posee un aumento en el contenido de ácido  
siálico. En una modalidad adicional de ejemplo, las LSD es  
15 mucopolisacaridosis tipo 7 (es decir, MPS 7, MPS VII (por sus  
siglas en inglés) o síndrome de Sly).

De acuerdo con la presente invención, el tratamiento de las  
LSD incluye cualquier forma de tratamiento de LSD, por  
20 ejemplo, la reducción de cualquier síntoma de las LSD, la  
reducción de la gravedad de cualquier síntoma de las LSD, la  
reducción de la duración de uno o más síntomas de las LSD, el  
tratamiento o inhibición de cualquier causa o condición  
relacionada con las LSD o la reducción de cualquier criterio

o medida clínica del grado o condición de las LSD.

De acuerdo con la presente invención, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante de la presente invención se administra en una pauta posológica para el tratamiento de una LSD. En una modalid  
5 ad, la LSD es MPS 7. Tal pauta posológica incluye una dosificación por administración, por día, cada dos semanas, así como también cantidad de dosis por ciclo de tratamiento o combinaciones de estos.

10

En general, la  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) de la presente invención puede administrarse en una dosificación de aproximadamente 0,1 mg a 20 mg, de 0,2 mg a 15 mg, de 0,5 a 12 mg, de 1 mg a 10 mg. de 1,5 mg a 8 mg, de 2 mg a 6 mg  
15 por kg. En algunas modalidades, la rhGUS se administra en una dosificación de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg o aproximadamente 12 mg por kg. En una modalidad de ejemplo, la rhGUS se administra en una dosificación de aproximadamente  
20 4 mg por kg. Las dosificaciones pueden ajustarse para la afección de cada paciente así como también otros fármacos que el paciente tome.

En algunas modalidades, tal dosificación se administra por

hora, diariamente, semanalmente (es decir, QW), cada dos semanas (es decir, QOW) o mensualmente.

En algunas modalidades, rhGUS se administra por hora, aproximadamente cada 1 a 24 horas, 1 a 20 horas, 1 a 16 horas, 1 a 12 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas, 1 a 2 horas o cada hora. En algunas modalidades, rhGUS se administra aproximadamente cada 2, 3, 4, 5 o 6 horas, o se administra aproximadamente cada 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos.

En algunas modalidades, rhGUS puede administrarse mediante infusión continua. En algunas modalidades, puede administrarse rhGUS al paciente durante períodos de tratamiento de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 10, 12 horas, o más, lo que puede mejorar la eficacia en algunas modalidades. En algunas modalidades, rhGUS se administra mediante infusión continua durante 1 a 24 horas, 1 a 20 horas, 1 a 16 horas, 1 a 12 horas, 1 a 10 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas o 1 a 2 horas. En algunas modalidades, rhGUS se administra mediante infusiones continuas durante aproximadamente 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos. En algunas modalidades, rhGUS se administra mediante infusión continua durante

aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas o más.

En una modalidad de ejemplo, rhGUS se administra mediante infusión continua durante aproximadamente 4 horas. En algunas

5 modalidades, los períodos de infusión continua se separan por períodos de no infusión (es decir, períodos en los que no se administra rhGUS). La infusión puede llevarse a cabo mediante medios adecuados, tal como por ejemplo mediante minibombas.

10 En algunas modalidades, rhGUS se administra aproximadamente cada 1 a 30 días, cada 1 a 25 días, cada 1 a 20 días, cada 1 a 14 días, cada 1 a 10 días, cada 1 a 5 días o diariamente.

En algunas modalidades, rhGUS se administra durante  
15 aproximadamente 1 a 12 semanas, 1 a 24 semanas, 1 a 36 semanas, 1 a 48 semanas, 1 a 60 semanas o 1 a 72 semanas. En algunas modalidades, la rhGUS se administra durante aproximadamente 1 mes, 4 meses, 8 meses, 12 meses, 16 meses, 20 meses o más. En algunas modalidades, la rhGUS se  
20 administra durante aproximadamente 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más. En algunas modalidades, la rhGUS se administra permanentemente (es decir, uso a largo plazo).

La rhGUS puede proporcionarse en forma liofilizada y

reconstituida con un diluyente estéril (por ejemplo, acuoso) antes de su administración. La rhGUS puede administrarse mediante cualquier vía eficaz, lo que incluye inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa o infusión y por vía oral. En determinadas modalidades de ejemplo, la rhGUS se administra por infusión intravenosa. Por lo general, la dosis pautada de rhGUS puede administrarse como una única dosis (por ejemplo, por inyección) o puede espaciarse durante el curso de 24 horas o menos, por ejemplo, mediante infusión continua o inyección repetida de una subdosis o similar o como se describe ampliamente en la presente. En una modalidad, la dosis pautada de rhGUS puede administrarse como una única inyección o como múltiples inyecciones.

15

En una modalidad, el paciente recibe aproximadamente cada dos semanas (es decir, QOW) la administración de rhGUS, en una dosis de entre aproximadamente 0,5 y 12 mg (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 4, 8, o 12 mg) por kg para reducir la gravedad de la LSD. En una modalidad de ejemplo, el paciente recibe aproximadamente cada dos semanas la administración de rhGUS en una dosis de aproximadamente 4 mg por kg. La pauta posológica puede continuar en algunas modalidades durante 12, 24, 36, 48 o 60 semanas o permanentemente (es decir, uso a

20

largo plazo).

De acuerdo con la presente invención, la rhGUS utilizada en métodos de la presente invención puede administrarse ya sea  
5 sola o en combinación con un cuidado estándar para la LSD o como parte de una pauta posológica que implica el estándar de cuidado para la LSD. En algunas modalidades, puede administrarse a los pacientes un antihistamínico profiláctico antes de cada infusión de rhGUS. En modalidades adicionales,  
10 puede administrarse a los pacientes una medicación antipirética (por ejemplo, ibuprofeno o paracetamol) antes de cada infusión de rhGUS.

De acuerdo con algunas modalidades de la presente invención,  
15 la administración de rhGUS proporciona un efecto terapéutico estadísticamente significativo. En una modalidad, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a uno o más estándares o criterios proporcionados por uno o más organismos reguladores en los Estados Unidos, por  
20 ejemplo, FDA (por sus siglas en inglés) u otros países. En otra modalidad, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según los resultados obtenidos de las condiciones/procedimiento de ensayo clínico aprobados por el organismo regulador.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según condiciones de ensayo clínico aleatorizado, controlados con placebo, enmascarado, cruzado sencillo. En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según los datos de un diseño de ensayo clínico por el que los sujetos se aleatorizan en uno de 4 grupos, cada uno representa una secuencia de tratamiento diferente en diferentes momentos predefinidos de modo enmascarado. En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según los datos de una población de pacientes de al menos 4, 6, 8, 10 o 12 sujetos. En una modalidad de ejemplo, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según los datos de una población de pacientes de 12 sujetos.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según un estudio que involucra 12 sujetos aleatorizados 1:1:1:1 a uno de cuatro grupos de secuencia de tratamiento ya sea para iniciar el tratamiento con 4 mg/kg rhGUS cada dos semanas (es decir, QOW) o placebo y cruzamiento a 4 mg/kg rhGUS QOW en diferentes momentos predefinidos. En algunas modalidades, el

efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según un estudio en sujetos dosificados ya sea con 4 mg/kg rhGUS o placebo QOW durante 48 semanas.

5 En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según un estudio donde se administra rhGUS QOW mediante infusión IV lenta durante un período de aproximadamente 4 horas. En algunas modalidades, los pacientes son premedicados con un  
10 antihistamínico profiláctico (por ejemplo, cetirizina o loratadina) antes de cada infusión de rhGUS.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina mediante la  
15 medición de los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) como el criterio de valoración primario. La amplia investigación llevada a cabo durante los últimos 20 años en cuanto a enfermedades MPS (por sus siglas en inglés) proporciona datos científicos significativos que permiten la  
20 calificación de los niveles de uGAG como un biomarcador que razonablemente tiene probabilidades de predecir un beneficio clínico. El proceso y mecanismo de acción de la enfermedad para las rhGUS en MPS 7 son bien comprendidos y los datos de otras enfermedades MPS similares con tratamientos de remplazo

enzimático (ERT, por sus siglas en inglés) comparables han establecido que uGAG es un marcador patofisiológico directo y fácil de medir del proceso de las enfermedades MPS y uGAG predice razonablemente el efecto del tratamiento y el beneficio clínico en las enfermedades MPS. En una modalidad de ejemplo, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según la determinación de los niveles de uGAG en un estudio clínico que involucra 12 sujetos que han sido tratados con 4 mg/kg rhGUS o placebo QOW durante un período de 48 semanas.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina utilizando medidas de eficacia secundarias (es decir, criterios de valoración secundarios), tal como un índice de respuesta con múltiples dominios y una evaluación de las respuestas clínicas individuales.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina utilizando un índice de respuesta con múltiples dominios, que combina análisis de múltiples dominios independientes para asegurar que la base más amplia para la eficacia puede evaluarse sin la complejidad de intentar construir criterios de valoración

compuestos calificados. En algunas modalidades, el índice de respuesta con múltiples dominios proporciona una evaluación de la eficacia de rhGUS en un amplio espectro de características clínicas observadas normalmente en pacientes con MPS 7.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina mediante la evaluación de las respuestas clínicas individuales (ICR, por sus siglas en inglés). Esta es una medida de la respuesta de cada sujeto al tratamiento que se selecciona según la importancia de la medida resultante según preocupaciones que ha informado el sujeto/padre/cuidador, la capacidad del sujeto de completar la evaluación clínica de manera fiable y el grado de deterioro de ese individuo. El uso de las ICR permite una evaluación de los beneficios clínicos de rhGUS al evaluar el cambio en un resultado clínico individual preespecificado que se considera el más relevante para cada sujeto y luego determinar una velocidad de respuesta total para la población en estudio. En algunas modalidades, las medidas de eficacia secundarias (es decir, criterios de valoración secundarios) pueden incluir la evaluación de sujetos en tratamiento en busca de señales y síntomas de MPS7 que interfieran más en la vida cotidiana del sujeto (es

decir, evaluación clínica de problemas). En algunas modalidades, la evaluación puede incluir pruebas de la función pulmonar, pruebas de caminar distancias, pruebas del rango de flexión del movimiento de los hombros y pruebas de la función motriz fina.

En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según datos con un valor alfa menor o igual que aproximadamente 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01. En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según datos con un intervalo de confianza mayor o igual que aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina según datos con un valor p menor o igual que aproximadamente 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01. En algunas modalidades, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina con la aprobación del ensayo clínico de Fase III de las composiciones y métodos que proporciona la presente invención, por ejemplo, la FDA en los Estados Unidos.

En general, el análisis estadístico puede incluir cualquier método adecuado permitido por un organismo regulador, por

ejemplo, FDA en los Estados Unidos o China o cualquier otro país. En algunas modalidades, el análisis estadístico incluye análisis no estratificados, análisis de rangos logarítmicos, por ejemplo de Kaplan-Meier, Jacobson-Truax, Gulliken-Lord-  
5 Novick, Edwards-Nunnally, Hageman-Arrindel y modelos lineales jerárquicos (HLM, por sus siglas en inglés) y análisis de regresión de Cox.

En algunas modalidades, los biomarcadores de almacenamiento  
10 lisosómico pueden utilizarse para predecir la respuesta al tratamiento y/o determinar la eficacia del tratamiento. En algunas modalidades, los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) pueden medirse y puede utilizarse una reducción en los niveles de uGAG como indicador de una respuesta  
15 positiva al tratamiento. En algunas modalidades, los niveles elevados del biomarcador de uGAG, que luego disminuyen tras la administración de rhGUS, predicen la respuesta al tratamiento. En algunas modalidades, esta información puede utilizarse para la determinación de una pauta posológica (tal  
20 como se describe en la presente) para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, MPS 7) utilizando rhGUS. Como tal, la presente invención proporciona métodos para determinar una pauta posológica que incluye la detección de una disminución en el nivel de un biomarcador de

LSD en una muestra biológica de y sujeto tratado con rhGUS y determinar una pauta posológica de rhGUS según una disminución en el nivel de uno o más biomarcadores de LSD en una muestra biológica. En algunas modalidades, el biomarcador de LSD es uGAG. En algunas modalidades, un nivel disminuido o reducido de uGAG indica la respuesta al tratamiento y/o eficacia de tratamiento del tratamiento con rhGUS. En algunas modalidades, la reducción en los niveles de uGAG a un nivel estándar predeterminado indica un mejor pronóstico de tratamiento con rhGUS.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: Producción y cuantificación del ácido siálico total**

La  $\beta$ -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) producida de acuerdo con la presente invención se marcó como GUS CR01. La proteína recombinante se produce de células de ovario de hámster chino (CHO) que se han modificado para expresar y secretar la enzima en el medio de cultivo utilizando un sistema de cultivo con biorreactor.

Se han producido lotes anteriores de  $\beta$ -glucuronidasa

(marcados GUS Lote 43/44) utilizando la misma línea celular mediante un proceso en el que las células se cultivan unidas a microportadores en un sistema de perfusión continua. Las células por lo general se expanden en el medio de cultivo que  
5 contiene suero fetal bovino (FBS). Luego, se lava el FBS y se reemplaza con medio que contiene hidrolisatos y se cultiva sobrenadante en modo de perfusión.

En oposición a los métodos informados anteriormente, GUS CR01  
10 se produjo en un sistema de cultivo en el que las células se cultivan en suspensión en un modo de lote alimentado. Otra diferencia es que GUS CR01 se cultivó solo en medio sin proteínas químicamente definido en oposición al medio que contiene suero que se utilizó previamente.

15

Un método para la cuantificación del ácido siálico total en GUS se desarrolló en el departamento de Control de Calidad de Rentschler Biotechnologie (RB) para la prueba de liberación del principio activo de GUS. En este método, se liberan los  
20 residuos de ácido siálico de las estructuras de glucano de rhGUS con hidrólisis ácida. El ácido siálico liberado se etiqueta luego con OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina) y se analiza mediante análisis HPLC (por sus siglas en inglés) de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés). A la

fecha, el Lote 43/44 y seis lotes producidos por RB de rhGUS se han analizado en RB en busca del ácido siálico total. Estos resultados (**Tabla 1**) son consistentes con el resultado observado en GlycoSolutions.

5

**Tabla 1. Resultados para el análisis de ácido siálico total de GUS**

10

15

20

| GUS Lote   | Método de producción                 | Ácido siálico (mol/mol monómero GUS) |
|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Lote 43/44 | Informe anterior                     | 0,04                                 |
| PR01       | De acuerdo con la presente invención | 1,0                                  |
| PR02       | De acuerdo con la presente invención | 0,7                                  |
| CR01       | De acuerdo con la presente invención | 1,1                                  |
| GMP1       | De acuerdo con la presente invención | 1,2                                  |

|      |                                      |     |
|------|--------------------------------------|-----|
| GMP2 | De acuerdo con la presente invención | 1,2 |
| GMP3 | De acuerdo con la presente invención | 1,2 |

5

**Ejemplo 2: Farmacocinética en ratas macho Sprague Dawley**

En este Ejemplo, las  $\beta$ -glucuronidasas humanas recombinantes producidas de acuerdo con la presente invención fueron comparadas a unas producidas tal como se informó previamente en la técnica. El objetivo de este estudio fue la evaluación de la farmacocinética y distribución en tejidos de las  $\beta$ -glucuronidasas humanas recombinantes administradas por vía intravenosa como una infusión única cada dos horas en ratas macho Sprague Dawley. La velocidad de infusión fue 1/3 del volumen total para la primera hora seguido de 2/3 del volumen total en la segunda hora. La pauta posológica se diseñó para simular la pauta posológica a ser utilizada en los pacientes.

**20 Materiales y métodos****Infusiones y artículos de prueba**

Se utilizaron tres artículos de prueba en este estudio:

cloruro de sodio al 0,9 % como control no enzimático, GUS CR01 y GUS Lote 43/44. Pueden encontrarse especificaciones completas para los artículos de prueba en la **Tabla 2**.

5 **Tabla 2. Artículos de prueba**

Artículo de prueba 1

Nombre: Cloruro de sodio 0,9 % para inyección, USP  
10 (solución salina)

Fuente: Baxter Healthcare (Marion, NC)

Propiedades físicas: Líquido claro

Identificador/Número de lote: C883827

Estado de esterilidad: Estéril

15 Condiciones de almacenamiento: Temperatura ambiente

Fecha de vencimiento 04/2014

Artículo de prueba 2

20 Nombre: GUS CR01

Fuente: Ultragenyx Pharmaceutical Inc. (Novato, CA)

Cantidad: ~32,5 mL

Concentración: 2,0 mg/mL

Unidades actividad GUS/ml 10,75 unidades M/ml

Unidades actividad específica/mg 5,35 unidades M/mg

Propiedades físicas: Líquido claro

Identificador/Número de lote: CR01

Condiciones de almacenamiento: 2 a 8 °C

5 Fecha de vencimiento: No se proporcionó

### Artículo de prueba 3

Nombre: GUS Lote 43/44

10 Fuente: Ultragenyx Pharmaceutical Inc. (Novato, CA)

Cantidad: ~25 mL

Concentración: 2,5 mg/mL\* (2,18 mg/ml)

Unidades actividad GUS/ml 11,4 unidades M/ml

unidades actividad específica/mg 5,23 unidades M/mg

15 Propiedades físicas: Líquido claro

Identificador/Número de lote: 43/44

Condiciones de almacenamiento: -60 a -80 °C

Fecha de vencimiento: No se proporcionó

20 Se realizó una infusión con los artículos de prueba a las ratas macho Sprague-Dawley a una dosis de ~2 mg/Kg peso corporal durante una única infusión que consistió de dos fases de 1 hora. Se realizó infusión de un tercio de la dosis durante la primera hora y dos tercios de la dosis durante la

segunda hora (Tabla 3).

**Tabla 3. Velocidad de infusión, dosis y cantidad de grupos de ratas**

5

10

15

20

| Grupo # | Artículo de prueba | Sexo | Edad | Vía de administración | Concentración de la dosis (mg/mL) | Velocidad de dosis (mL/min)                                  | Dosis total (mg/kg) | Dosis real* (mg/kg) |
|---------|--------------------|------|------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1       | Solución salina    | M    | 5    | iv                    | n/a                               | 1 <sup>era</sup> h:<br>0,99<br>2 <sup>da</sup> hora:<br>1,98 | n/a                 | n/a                 |
| 2       | GUS lote: CR01     | M    | 5    | iv                    | 0,203                             | 1 <sup>era</sup> h:<br>0,94                                  | ~2 <sup>1</sup>     | ~2 <sup>1</sup>     |

|  |     |  |  |  |  |                               |  |  |
|--|-----|--|--|--|--|-------------------------------|--|--|
|  |     |  |  |  |  | 2 <sup>da</sup> hora:<br>1,87 |  |  |
|  | GUS |  |  |  |  | 1 <sup>era</sup> h:<br>0,78   |  |  |

5

<sup>1</sup>La dosis se basó en el peso corporal promedio de las cinco ratas de cada grupo.

10 \* La dosis para GUS Lote 43/44 se basó originalmente en un valor de proteínas de 2,5 mg/ml determinado por ensayo BCA. Si la concentración de proteínas se basó en la absorbancia a OD 280 y un coeficiente de extinción de 2,12, la dosis real fue  $84,8 \% \times 2 = 1,7 \text{ mg/Kg}$ .

15

Se tomaron muestras de sangre de cada rata pretratamiento y luego en intervalos durante las fases de infusión lenta, infusión rápida y luego de la infusión según la pauta terapéutica de la **Tabla 4**. Se permitió que la sangre  
20 coagulara, se separó el suero y se almacenó congelado a -80 °C, envío pendiente en hielo seco para análisis.

**Tabla 4. Pauta terapéutica de infusión y sangrado**

|    |                            |                                          |
|----|----------------------------|------------------------------------------|
|    | Etapa                      | Intervalo nominal                        |
|    |                            | Predososis                               |
| 5  | Infusión<br>lenta          | 2 min luego del inicio de la infusión    |
|    |                            | 10 min luego del inicio de la infusión   |
|    |                            | 30 min luego del inicio de la infusión   |
|    |                            | 60 min luego del inicio de la infusión   |
|    | Infusión<br>rápida         | 120 min luego del inicio de la infusión  |
| 10 | Luego de<br>la<br>infusión | 2 min (luego del final de la infusión)   |
|    |                            | 10 min (luego del final de la infusión)  |
|    |                            | 30 min (luego del final de la infusión)  |
|    |                            | 60 min (luego del final de la infusión)  |
| 15 |                            | 120 min (luego del final de la infusión) |
|    |                            | 240 min (luego del final de la infusión) |
|    |                            | 480 min (luego del final de la infusión) |
|    |                            | 24 hr (luego del final de la infusión)   |

20

### **Actividad de GUS en suero**

Se determinó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa como se muestra a continuación: 25  $\mu$ L de suero diluido 1:4 respecto a 1:300

en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,8, y se mezcló 1 mg/mL de BSA cristalino con 50  $\mu$ L de sustrato de 4-MU- $\beta$ -D-glucuronida 10 mM en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,8, de 1 mg/mL BSA cristalino. Todas las soluciones fueron precalentadas a 37 °C, mezcladas, luego incubadas a 37 ° C durante 30 minutos. Se detuvieron los ensayos mediante la adición de 200  $\mu$ L de carbonato de glicina, pH 10,5 y se leyó en una placa de lectura M2<sup>e</sup> de Molecular Devices en longitudes de onda de emisión/excitación de 366/446 nm. Se expresó la actividad como 1 unidad = 1 nmol 4MU liberado/mL/hr a 37° C.

#### **Actividad de GUS en tejidos**

Se recolectaron tejidos en la autopsia y se colocaron en crioviales, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 ° C envío pendiente en hielo seco para análisis. La distribución de la actividad de GUS en los tejidos se evaluó como se muestra a continuación. Se descongelaron especímenes de tejido completos o parciales y se combinaron con 10 a 20 volúmenes de Tris 25 mM, NaCl 140 mM, fluoruro de sulfonil fenilmetilo 1 mM, pH 7,2. Se prepararon homogenados utilizando un homogenizador Polytron de Kinematica durante 30 segundos en hielo; los homogenados resultantes se congelaron/descongelaron una vez (a -80 ° C) seguido por sonicación durante 20 segundos con enfriamiento en hielo. Se

analizó un volumen total de 25  $\mu$ L de cada homogenado para  $\beta$ -glucuronidasa utilizando 4MU- $\beta$ -glucuronida como se describió previamente. La concentración de proteínas de los homogenados se determinó mediante el método de ácido bicinconínico. Los  
5 niveles de  $\beta$ -glucuronidasa en tejido se expresaron como nmoles de 4MU hidrolizado/hr/mg proteína.

### **Resultados y exposición**

#### 10 **Farmacocinética de GUS CR01 en oposición a GUS Lote 43/44 en el plasma**

La **Figura 1** presenta la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en los sueros de ratas de cada grupo de infusión durante la  
15 etapa de infusión lenta, la etapa de infusión rápida y la etapa posinfusión. La curva del Grupo 1 con infusión con solución salina únicamente indica el nivel endógeno lento de la  $\beta$ -glucuronidasa de rata que se encuentra presente en los sueros de estas ratas. El nivel endógeno ha sido restado de  
20 los valores en las otras dos gráficas de las ratas con infusión con enzimas.

Las gráficas tanto para GUS CR01 como GUS Lote 43/44 presentan un aumento dependiente del tiempo en los niveles de

actividad enzimática que alcanzan un nivel constante el final del período de infusión, luego aumenta de nuevo concomitantemente con el inicio del período de infusión rápida. Sin embargo, en oposición, GUS CR01 alcanza un nivel en suero 2 veces mayor al final del período de infusión lenta y 3 veces mayor al final del de infusión rápida en comparación con GUS Lote 43/44. También puede verse en la **Figura 1** que la eliminación rápida de ambas enzimas del suero luego de las infusiones cesa, lo que es característico de las enzimas lisosómicas en general.

En la **Figura 2**, presentamos la fase de eliminación posinfusión para ambas enzimas de las que se calcularon los valores  $t_{1/2}$ . GUS Lote 43/44 se eliminó de la circulación con un  $t_{1/2}$  1<sup>era</sup> fase de 4,50 minutos. En oposición, GUS CR01 se elimina un poco más lento a  $t_{1/2}$  de 5,30 minutos. Los datos de eliminación sin procesar fueron analizados por un método diferente para recalcularlos valores  $t_{1/2}$  (**Figura 4**).  $C_{max}$  (14800 para GUS CR01 en oposición a 4300 para GUS lote 43/44) y AUC-t (18700 en oposición a 5580) también muestran 3 veces mayor para GUS (**Tabla 5**). El  $t_{1/2}$  se calculó de manera muy diferente ya que solo la segunda fase se tomó en cuenta. Para GUS CR01,  $t_{1/2}$  2<sup>da</sup> fase es 1,1 hr y 0,967 hr para GUS lote 43/44 (**Tabla 5**).

Tabla 5.

| Grupos           | Animal           | Cmax<br>(Unidades/<br>mL) | Tmax<br>(h) | AUC0-t<br>(h*unidades/<br>mL) | AUC0-inf<br>(h*unidades/<br>mL) | Semivida<br>(h) | Eliminación<br>(min*unidades/<br>mL)/(mg/kg) | Vz<br>(Unidades/<br>mL)/(mg/kg) |
|------------------|------------------|---------------------------|-------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|---------------------------------|
| Gp 2 6-10 CR01   | 2-6              | 12900                     | 0           | 15300                         | 15500                           | 2.05            | 2.19E-06                                     | 0.000389                        |
|                  | 2-7              | 14200                     | 0           | 16900                         | 16900                           | 0.794           | 2.01E-06                                     | 0.000138                        |
|                  | 2-8              | 14200                     | 0           | 18300                         | 18400                           | 0.926           | 1.84E-06                                     | 0.000148                        |
|                  | 2-9              | 16700                     | 0           | 22800                         | 23000                           | 1.03            | 1.47E-06                                     | 0.000132                        |
|                  | 2-10             | 16000                     | 0           | 20300                         | 20300                           | 0.67            | 1.66E-06                                     | 9.65E-05                        |
|                  | Media            | 14800                     | 0           | 18700                         | 18800                           | 1.1             | 1.84E-06                                     | 0.000181                        |
|                  | CV%              | 10.4                      |             | 15.7                          | 15.7                            | 50.5            | 15.3                                         | 65.4                            |
|                  | Media geométrica | 14800                     |             | 18500                         | 18600                           | 1.01            | 1.82E-06                                     | 0.000159                        |
| Gp 3 11-15 43/44 | 3-11             | 4640                      | 0           | 5380                          | 5380                            | 0.677           | 6.26E-06                                     | 0.000367                        |
|                  | 3-12             | 7010                      | 0.03        | 6940                          | 6950                            | 0.832           | 4.84E-06                                     | 0.000349                        |
|                  | 3-13             | 4870                      | 0           | 6220                          | 6250                            | 1.02            | 5.38E-06                                     | 0.000476                        |
|                  | 3-14             | 2740                      | 0.03        | 5420                          | 5430                            | 1.39            | 6.20E-06                                     | 0.000747                        |
|                  | 3-15             | 2270                      | 0           | 3970                          | 3980                            | 0.913           | 8.45E-06                                     | 0.000668                        |
|                  | Media            | 4300                      | 0.0133      | 5580                          | 5600                            | 0.967           | 6.23E-06                                     | 0.000521                        |
|                  | CV%              | 44                        | 136.9       | 19.9                          | 19.8                            | 27.8            | 22.1                                         | 34.4                            |
|                  | Media geométrica | 3970                      |             | 5490                          | 5510                            | 0.939           | 6.11E-06                                     | 0.000497                        |

### Distribución en tejidos de GUS CR01 en oposición a GUS

#### Lote 43/44

Además de la eliminación de las dos enzimas, evaluamos la distribución en tejidos de GUS CR01 en comparación con GUS Lote 43/44 en hígado, bazo, corazón, riñones, cerebro y pulmones. Los extractos de tejido preparados de cada uno de estos tejidos se evaluaron en busca de  $\beta$ -glucuronidasa y proteínas tal como se describió en los métodos. Los resultados de los ensayos se expresaron como unidades de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa/mg de proteína en tejidos. El resumen de estos ensayos se puede ver en la **Figura 3**. En cada

una de las gráficas de esta figura, se muestran los niveles enzimáticos totales, inclusive de  $\beta$ -glucuronidasa de rata endógena en el costado izquierdo. En el costado derecho de cada gráfica se ha suprimido el nivel enzimático endógeno promedio del nivel enzimático total. El nivel de  $\beta$ -glucuronidasa endógena promedio de cada tejido se calculó utilizando valores de las cinco ratas del Grupo 1 con infusión con solución salina.

En cada tejido, el nivel de GUS en las ratas con infusión, ya sea de GUS CR01 o GUS Lote 43/44, es mayor que en las ratas con infusión con solución salina. Cuando los niveles de GUS endógeno se suprimen, resulta evidente que las ratas con infusión con GUS CR01 contienen niveles de GUS que son al menos dos veces mayores que las ratas con infusión con GUS Lote 43/44.

El presente estudio se diseñó para evaluar la farmacocinética de  $\beta$ -glucuronidasa y las propiedades de distribución en tejidos de GUS CR01 y GUS Lote 43/44. El presente estudio determinó que GUS CR01 se eliminó de la circulación con un  $t_{1/2}$  1<sup>era</sup> fase de 5,30 minutos, en comparación con  $t_{1/2}$  más rápido de 4,50 minutos para GUS Lote 43/44. El  $t_{1/2}$  segunda fase también es un poco mayor para GUS CR01.

Se demostraron más diferencias significativas para entre las 2 enzimas para  $C_{max}$ , AUC-t y distribución de tejidos. La concentración máxima ( $C_{max}$ ) de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en el suero al final del período de infusión de dos horas para GUS CR01 fue 14.829 unidades/ml, 4,2 veces la concentración de 3537 unidades/ml obtenida por GUS Lote 43/44. Este aumento en la  $C_{max}$  podría explicarse por la acumulación de la enzima de eliminación más lenta a una concentración más elevado en sangre durante el período de infusión. AUC-t también aumentó mucho (más de 3 veces) con GUS CR01 en oposición a GUS Lote 43/44, tal como se representó en la **Figura 1**.

Por último, observamos en todos los tejidos analizados que GUS CR01 se administró a los tejidos en niveles de hasta dos veces o más que con GUS Lote 43/44. Se sabe que cambiar las características de eliminación de una enzima lisosómica de la circulación tiene efectos en la distribución en los tejidos. Es concebible que el enlentecimiento de  $t_{1/2}$  de GUS CR01 en la circulación podría permitir una distribución más eficiente de la enzima para tejidos seleccionados. Resulta más importante que los cambios en la distribución en los tejidos para tener muy buena correlación con los cambios de la  $C_{max}$  y AUC-t. Como puede verse en la **Figura 3**, las barras de error son

bastante grandes, lo que refleja un intervalo grande de valores obtenidos en las ratas individuales de cada grupo en estudio. La repetición de los ensayos de  $\beta$ -glucuronidasa por triplicado en los tejidos seleccionados confirmó los valores originales que nos llevan a creer que el intervalo amplio de valores vistos en estas ratas eran reales.

Anteriormente, los análisis de GUS CR01 demostraron que mientras el nivel de manosa 6 fosfato y la mayoría de las otras propiedades son similares entre las 2 enzimas, el contenido de ácido siálico de GUS CR01 es 28 veces el de GUS Lote 43/44 (1,1 mol/mol monómero GUS en oposición a 0,04 mol/mol monómero GUS) Véase la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Características de GUS CR01 y GUS Lote 43/44**

| Característica<br>/Ensayo             | Unidad<br>es              | GUS<br>CR01 | GUS Lote<br>43/44 | GMP1 | GMP2 | GMP3* |
|---------------------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|------|------|-------|
| Título                                | mg/L                      | ~400        | ~50               | ~400 | ~400 | ~400  |
| pH                                    | -log<br>[H <sup>+</sup> ] | 7,4         | 7,5               | 7,4  | 7,6  | 6,0   |
| Pureza<br><br>(Reducción<br>SDS-PAGE) | %                         | 99,2        | >95,0             | 99,2 | 98,8 | 99,3  |

|    |                                              |                                        |              |              |            |            |            |
|----|----------------------------------------------|----------------------------------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|
| 5  | Tetrámero (SE-HPLC)                          | %                                      | 97,7         | 99,0         | 98,4       | 98,6       | 99,1       |
|    | Tetrámero peso molecular                     | Daltons                                | 290.249      | 300.000      | 300,000    | 300,000    | 300,000    |
|    | Coeficiente extinción masa                   | (mg/mL) <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> | 2,08         | ---          | 2,0        | 2,0        | 2,1        |
|    | Heterogeneidad de carga (IEF)                | Intervalo pH                           | comparable   | 6,6-7,7      | comparable | comparable | comparable |
| 10 | Análisis glucano M6P N (Suma de picos 15-17) | % en moles                             | 14,2         | comparable   | 14         | 14         | 12         |
| 15 | Contenido de ácido siálico                   | (moles/mol)                            | 1,1          | 0,04         | 1,2        | 1,2        | 1,2        |
| 20 | Actividad específica                         | (MU/mg)                                | 3,6          | 3,70         | 3,9        | 3,7        | 3,5        |
|    | Absorción celular                            | Absorción K nM                         | 1,2 - 1,7    | 1,4          | 1,8        | 1,6        | 1,4        |
|    | Semivida en fibroblastos MPS7                | Días 0-21d<br>5-21d                    | 20,0<br>21,6 | 18,9<br>20,5 | NA         | NA         | NA         |

\* El análisis de monosacáridos indicó que el 71 % de los residuos de galactosa en GUS GMP3 se encontraban sialilados.

Al juntar todos los datos resulta evidente que la mejor  
5 distribución en tejidos de GUS CR01 que se demostró en la  
presente se debe a su aumento en contenido de ácido siálico  
ya que se sabe que el ácido siálico enlentece la eliminación  
de glicoproteínas de la circulación mediante receptores de  
manosa ubicados en las células enteliales en el interior de  
10 las paredes de los vasos sanguíneos. La combinación de  
niveles elevados de ácido siálico y los restos de afinidad  
elevada de manosa-6-fosfato proporciona una combinación  
óptima para la reducción de absorción en tejidos mediante  
otros receptores de carbohidratos debido al contenido elevado  
15 de ácido siálico, lo que asegura concentraciones elevadas en  
la circulación y luego logra una excelente absorción en  
tejidos en los tejidos diana debido a los niveles de afinidad  
elevada de la manosa-6-fosfato.

### 20 **Ejemplo 3: Tratamiento de MPS VII utilizando tratamiento de reemplazo enzimático**

El objetivo de este ejemplo es demostrar que el tratamiento  
de reemplazo enzimático para la mucopolisacaridosis tipo VII

(es decir, MPS VII; síndrome de Sly) utilizando  $\beta$ -glucuronidasa humana producida de forma recombinante (rhGUS) reduce el almacenamiento lisosómico en un estudio clínico de 36 semanas.

5

En este ejemplo, a tres sujetos diagnosticados con MPS VII se administró rhGUS con un aumento en el contenido de ácido siálico. La dosificación se realizó de acuerdo con la siguiente pauta terapéutica de 36 semanas:

- 10 Semanas 1-12: 2 mg/kg cada dos semanas;  
Semanas 13-20: 1 mg/kg cada dos semanas;  
Semanas 21-28: 4 mg/kg cada dos semanas; y  
Semanas 29-36: 2 mg/kg cada dos semanas.

- 15 La seguridad y eficacia de rhGUS se evaluó durante la pauta terapéutica de 36 semanas. El compuesto de rhGUS parece ser seguro y bien tolerado. Es importante que no se observaron eventos adversos graves hasta las 36 semanas y no hubo reacciones relacionadas con el fármaco o relacionadas con  
20 hipersensibilidad a la infusión en ninguno de los tres sujetos.

Para medir la eficacia, se evaluaron primero los niveles en suero y orina de glicosaminoglicanos (GAG), ya que la

acumulación lisosómica de GAG es una marca distintiva de deficiencia de GUS. Se observó una reducción rápida y sostenida dependiente de la dosis en los glicosaminoglicanos en orina (uGAG) en los sujetos tratados con rhGUS. Ver **Figura**

5 **4.** La reducción media en uGAG al final de cada intervalo de dosificación se muestra en la **Figura 5** e ilustra que una dosis de 4 mg/kg tuvo como resultado la reducción más grande de los niveles de uGAG.

También se observó una reducción progresiva en  
10 glicosaminoglicanos en suero (GAG) en los tres sujetos tratados con rhGUS. Cabe destacar que cada sujeto demostró al menos un 25 % de reducción en los niveles de GAG en suero al final de la pauta terapéutica de 36 semanas. Ver **Figura 6.**

15 Por último, se evaluó el tamaño del hígado en sujetos tratados con rhGUS, ya que frecuentemente se observa un tamaño agrandado del hígado en pacientes que sufren MPS VII. Hubo una reducción significativa en la hepatomegalia que resulta del protocolo de tratamiento de 36 semanas. Ver  
20 **Figura 7.**

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la

técnica a la cual pertenece la presente solicitud. Si bien puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica o prueba de la presente solicitud, se describieron en la  
5 presente métodos y materiales representativos.

Si bien la invención se ha descrito respecto a modalidades específicas de esta, se entenderá que es pasible de modificaciones adicionales y la presente solicitud tiene la  
10 intención de cubrir todas las variaciones, usos o adaptaciones de la invención que sigan, en general, los principios de la invención e inclusive aquellos alejamientos de la presente descripción que constituyen prácticas usuales o bien conocidas dentro de la técnica a la que pertenece la  
15 invención y que puedan aplicarse a las características esenciales establecidas anteriormente en la presente y tal como sigue a continuación en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20 Las descripciones, inclusive las reivindicaciones, figuras y/o dibujos de cada una de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en la presente se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencias. En caso de que exista algún conflicto entre una referencia citada y

la presente memoria descriptiva, prevalecerá la memoria descriptiva. Al describir modalidades de la presente invención, se utiliza terminología específica para ser claros. Sin embargo, no se pretende que la invención se limite a la terminología específica seleccionada con este fin. Nada en esta memoria descriptiva debe considerarse como taxativo del alcance de la presente invención. Todos los ejemplos presentados son representativos y no taxativos. Las modalidades antemencionadas pueden modificarse o variarse sin apartarse de la invención, tal como apreciará el experto en la técnica teniendo en cuenta las enseñanzas que anteceden.

15

20

### **REIVINDICACIONES**

1. Una glicoproteína recombinante, en donde la glicoproteína recombinante es  $\beta$ -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de 0,7 mol/mol a 1.4 mol/mol de la glicoproteína recombinante, en donde la  $\beta$ -glucuronidasa humana comprende la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 1.
2. La glicoproteína recombinante de la reivindicación 1, en donde la glicoproteína recombinante tiene un nivel de manosa-6-fosfato (M6P) en fracciones de 10% mol a 15% mol del total de glucano de la glucoproteína recombinante.
3. La glicoproteína recombinante de la reivindicación 1, en donde la glicoproteína recombinante tiene un contenido de sialilación de 1 mol/mol a 1.4 mol/mol y un nivel de fracciones de M6P de 10% mol a 15% del total de glucano de la glicoproteína recombinante.
4. Un método para producir la glicoproteína recombinante de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
  - (a) Suministrar un medio definido químicamente libre de proteínas; y
  - (b) Cultivar células que han sido modificadas para expresar la glicoproteína recombinante en el medio, produciendo la glicoproteína recombinante.
5. El método de la reivindicación 4, en donde las células son células de ovario de hámster chino (CHO).
6. El método de la reivindicación 4, en donde las células son cultivadas en un modo de lote alimentado.

## MINI-REVIEW

# Increasing the Sialylation of Therapeutic Glycoproteins: The Potential of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway

KAYA BORK, RÜDIGER HORSTKORTE, WENKE WEIDEMANN

Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Hollystr.1 D-06114 Halle, Germany

Received 29 August 2008; accepted 10 December 2008

Published online 6 February 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.21684

**ABSTRACT:** The number of therapeutic proteins has increased dramatically over the past years and most of the therapeutic proteins in the market today are glycoproteins. Usually, recombinant glycoproteins are produced in mammalian cell lines, such as Chinese-hamster-ovary-cells to obtain mammalian-type of glycosylation. The terminal monosaccharide of N-linked complex glycans is typically occupied by sialic acid. Presence of this sialic acid affects absorption, serum half-life, and clearance from the serum, as well as the physical, chemical and immunogenic properties of the respective glycoprotein. From a manufacturing perspective, the degree of sialylation is crucial since sialylation varies the function of the product. In addition, insufficient or inconsistent sialylation is also a major problem for the process consistency. Sialylation of over-expressed glycoproteins in all mammalian cell lines commonly used in biotechnology for the production of therapeutic glycoproteins is incomplete and there is a need for strategies leading to homogenous, naturally sialylated glycoproteins. This review will shortly summarize the biosynthesis of sialic acids and describe some recent strategies to increase or modify sialylation of specific therapeutic glycoproteins. © 2009 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 98:3499–3508, 2009

**Keywords:** sialic acid; recombinant glycoproteins; therapeutic proteins; protein stability

## RECOMBINANT THERAPEUTIC PROTEINS AND GLYCOSYLATION

Major demographic shifts in the industrial nations will prompt numerous changes in social and health systems. The need for novel drugs fighting serious diseases such as cancer or disorders of the central nervous system will grow rapidly. Two very different strategies are used

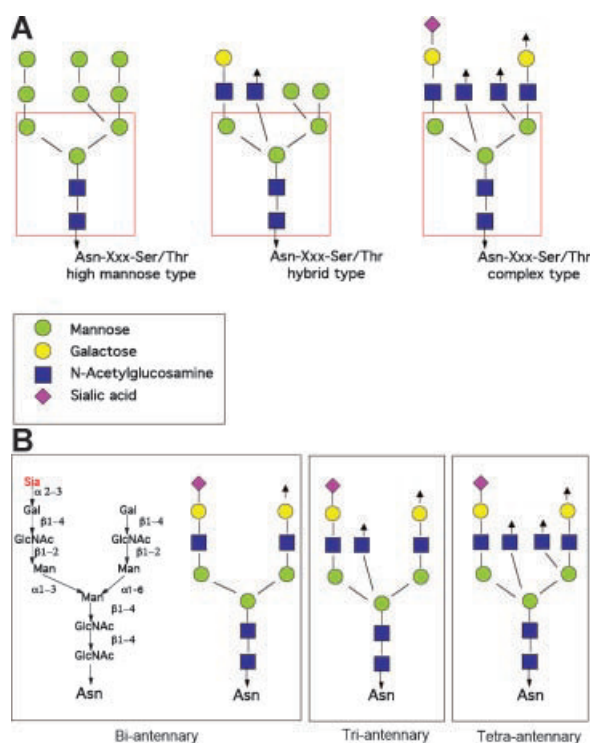
for the development for those novel drugs: (I) High-throughput screens of small molecules libraries to identify new drug candidates<sup>1,2</sup> and (II) Development of specific therapeutic proteins using recombinant DNA technologies.<sup>3,4</sup> Both strategies have advantages and disadvantages. Here we will focus on therapeutic glycoproteins. Due to their outstanding specificity, therapeutic glycoproteins will revolutionize our possibilities to treat serious diseases. However, there are several restrictions and problems during the production process, purification and application. In nature, nearly all proteins outside the cell are glycoproteins and glycosylation represents the most common posttranslational modification of

Correspondence to: Rüdiger Horstkorte (Telephone: 49-345-5573873; Fax: 49-345-5573804; E-mail: ruediger.horstkorte@medizin.uni-halle.de)

*Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 98, 3499–3508 (2009)

© 2009 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

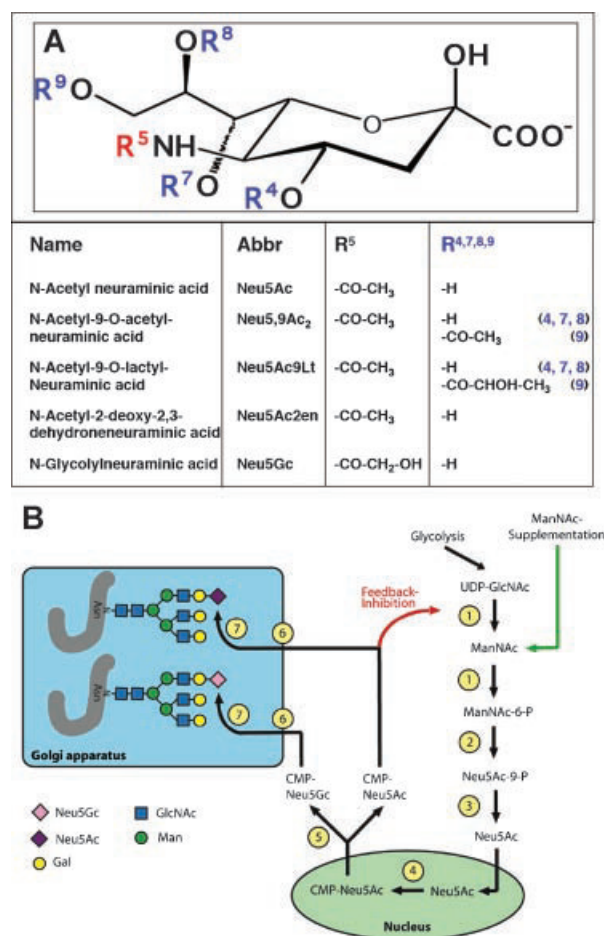
proteins.<sup>5-7</sup> Glycosylation has dramatic impact on the function, stability, solubility and immunogenicity of recombinant glycoproteins.<sup>8,9</sup> This explains the general interest for novel strategies to engineer glycosylation and to increase the value of therapeutic proteins. However, glycosylation is not directly encoded by the genome and by far not understood.<sup>10</sup> Glycans of glycoproteins are synthesized in the Golgi apparatus by specific glycosyltransferases, which attach nucleotide-activated monosaccharides to specific sugar residues of glycoproteins.<sup>11</sup> Although these glycans have a common core structure (Fig. 1A) the combination of different monosaccharides and different linkage-type allows the cell to create an enormous number of different structures. The terminal and most exposed monosaccharide of most glycoproteins is sialic acid,<sup>12</sup> which will be in the focus of this review (Fig. 1B).



**Figure 1.** Diversity of glycosylation. (A) Schematic structure of three major types of *N*-glycans. The arrows indicate further diverse glycosylation. A red box indicates the common core structure. (B) Branching of typical *N*-glycans. The arrows indicate further diverse glycosylation. The potential linkages are shown in the left bi-antennary structure.

## SIALYLATION OF (THERAPEUTIC) GLYCOPROTEINS

Sialic acids represent a family of aminosugars with 9-carbons with over 50 members derived from *N*-acetylneuraminic acid<sup>12,13</sup> (Fig. 2A). Most mammals express *N*-glycolylneuraminic acid, the hydroxylated form of *N*-acetylneuraminic acid at position C5. However, humans express predominantly *N*-acetylneuraminic acid, due to a



**Figure 2.** (A) Structure of sialic acids. (B) Biosynthesis pathway of sialic acid and feedback inhibition of the GNE. Enzymes: (1) GNE = UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase, (2) *N*-acetylneuraminic acid-9-phosphate synthase, (3) *N*-acetylneuraminic acid-9-phosphatase, (4) CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase, (5) CMP-*N*-acetylneuraminic acid Golgi transporter, (6) Several specific sialic acid transferases. Figure modified and printed with permission from Bork et al.<sup>49</sup>

homozygous mutation in the CMP-neuraminic acid hydroxylase gene in the human genome. *N*-glycolylneuraminic acid is antigenic to humans,<sup>14,15</sup> is enriched in tumor cells and is originated most probably from the diet.<sup>16</sup> This is an important issue since this is one of the reasons why the nonhuman *N*-glycolylneuraminic acid has to be avoided in any production process of recombinant therapeutic glycoproteins. This problem has been overcome recently by using antisense strategies to reduce the activity of the CMP-neuraminic acid hydroxylase in CHO-cells.<sup>17</sup> The respective sialic acids possess different highly specific recognition and binding properties for a variety of cellular receptors.<sup>18</sup> This structural and functional diversity of sialic acid is exploited by viruses, bacteria and toxins, and by the sialoglycoproteins and sialoglycolipids involved in cell-cell, cell-matrix or molecular recognition.<sup>19</sup>

Sialic acid is only one component out of several monosaccharides building glycans of glycoproteins, but has an outstanding impact on the quality and stability of any therapeutic glycoproteins for several reasons: (I) terminal galactose residues are one of the major factors determining the serum half-life of glycoproteins. The serum half-life is regulated by the expression of liver asialo-glycoprotein receptors. These receptors bind nonsialylated glycoproteins (on free galactose residues, see Fig. 1) and bound asialo-glycoproteins are removed from the serum by endocytosis.<sup>20</sup> As a consequence, expression of terminal sialic acid on galactose residues prevents serum glycoproteins from degradation.<sup>21</sup> (II) Sialic acids are important for masking antigenic determinants or epitopes.<sup>12</sup> It is known that the receptors of the immune system (T- and B-cell receptors) often prefer nonsialylated structures. Therefore, the possibility of the generation of antibodies (neutralizing antibodies) against the therapeutic glycoproteins<sup>22</sup> correlates with the degree of its sialylation. (III) Negatively charged sialic acids influence protein-specific parameters such as the thermal stability,<sup>23</sup> the resistance to proteolytic degradation<sup>24</sup> or its solubility.<sup>25</sup>

For these reasons, sialic acids are crucial for the production process and especially for the approval of therapeutic glycoproteins. Manufacturers have to ensure the homogeneity of each batch of therapeutic glycoproteins. This includes the degree of sialylation. Therefore, great efforts have been done to standardize sialylation during the fermentation process since in many cases only

one third of the primary glycoprotein after the fermentation fulfils the standard of homogenous glycosylation/sialylation.

In the following, we will introduce the biosynthesis of sialic acid and consequently present some aspects and possibilities to improve and/or engineer higher levels of sialylation.

## BIOSYNTHESIS AND ACTIVATION OF SIALIC ACID

The initial reaction in the pathway to form free sialic acid is a conversion of UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) to *N*-acetyl D-mannosamine (ManNAc) since the physiological precursor of all sialic acids is ManNAc (Fig. 2B). ManNAc is formed from UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) by epimerization of the hydroxyl-group in position 2 and cleavage of UDP by the UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase.<sup>26</sup> Cardini and Leloir originally discovered this enzyme in rat liver.<sup>27</sup> All ManNAc produced by the UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase is metabolized to sialic acid. The biosynthesis of sialic acid is regulated by the feedback inhibition of the key enzyme of sialic acid biosynthesis, the UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE). GNE is a bifunctional enzyme, which catalyzes the conversion of UDP-GlcNAc to ManNAc and the phosphorylation of ManNAc to ManNAc-6-phosphate<sup>26,28</sup> (see Fig. 2B). The next step is a condensation of ManNAc-6-P and pyruvate resulting in sialic acid-9-phosphate by the *N*-acetyl-D-neuraminy-9-phosphate synthase.<sup>29,30</sup> The formation of *N*-acetyl neuraminic acid is completed by specific phosphatase acting on sialic acid-9-phosphate.<sup>31</sup> Then, the resulting primary sialic acid (*N*-acetyl neuraminic acid) is either modified to the other members of the sialic acid family or is activated in the nucleus to CMP-sialic acid.<sup>32,33</sup> It is very important to mention, that CMP-sialic acid inhibits the epimerase activity of GNE in a feedback dependent manner.<sup>34</sup> CMP-sialic acids are then transported to the Golgi apparatus by a specific CMP-sialic acid transporter<sup>35</sup> and attached to free galactose residues by specific sialyltransferases.<sup>36</sup> Since not only mammalian, but also plant cells, which are not able to generate mammalian type of glycosylation are used for the production of glycoproteins, these cells have to be engineered with the proper glycosylation machinery.<sup>37</sup> However, plant cell

glycosylation and sialylation is not the focus of this review.

## INCREASING SIALYLATION OF RECOMBINANT GLYCOPROTEINS

Several approaches have been made to enhance sialylation of glycoproteins and to maximize the yield of high quality glycoproteins for therapeutic use in mammalian cell lines.

### Application of ManNAc

As described above, *N*-acetylmannosamine (ManNAc) is the specific precursor for increasing intracellular sialic acid pools.<sup>38</sup> To bypass the GNE-feedback mechanism (the rate-limiting step in the biosynthesis of sialic acids), cells can be supplemented with ManNAc, which intercept the pathway beyond the feedback mechanism of GNE (see Fig. 2B), since only the epimerase activity of the GNE is feedback-controlled. Any cellular ManNAc is phosphorylated and subsequently converted to sialic acid. Supplementation with ManNAc therefore leads to an increased intracellular concentration of sialic acids. However, aminosugars such as ManNAc does not easily pass the cell membrane<sup>39</sup> and there is no detailed cellular uptake mechanism known (most probably, ManNAc is taken up during endo- or pinocytosis). This is one reason, why very high concentrations (mM range) have to be used to increase intracellular ManNAc levels and sialylation.<sup>40</sup> Recent studies revealed that application of peracetylated ManNAc, which can cross the plasma membrane, helps to reduce the concentration needed to increase sialylation.<sup>41</sup>

It was reported that ManNAc feeding to Chinese-hamster-ovary-cells (CHO-cells), producing recombinant human interferon-gamma (CHO IFN- $\gamma$ ) increased intracellular sialic acid concentration.<sup>42</sup> Interferons (IFNs) are proteins produced by a wide variety of cells of the immune system of many vertebrates in response to challenges by foreign pathogens such as viruses, parasites or tumor cells.<sup>43</sup> IFNs belong to the large class of glycoproteins known as cytokines. They assist the immune system to response by (I) inhibiting viral replication within the host cells, (II) Activating natural killer cells and macrophages, (III) Increasing antigen presentation to lymphocytes, and (IV) Inducing the resistance of

host cells to viral infection. Interferon- $\gamma$  exists in three sialylated glycoforms: double-glycosylated (at Asn25 and Asn97), single glycosylated (at Asn25) or nonglycosylated.<sup>44</sup> Without further efforts, 25% of the total IFN- $\gamma$  produced in CHO-cells is nonsialylated after 140 h,<sup>45</sup> which is a nontolerated reproducibly for a production process. Application of ManNAc led to a 15% increasing in the sialylation of IFN- $\gamma$  and saturation was reached with the addition of 40 mM ManNAc.<sup>42</sup>

This approach was also successfully adopted to increase the sialylation of erythropoietin (EPO). EPO is a glycoprotein hormone that is a cytokine for erythrocyte precursors cells.<sup>46</sup> Of all clinical approved recombinant growth factors, EPO has the broadest indication spectrum and economic potential. EPO is available as a therapeutic agent produced by recombinant DNA technology in mammalian CHO-cells and is used in treating anemia resulting from chronic kidney disease, from the treatment of cancer (chemotherapy and radiation), and from other critical illnesses (heart failure or chronic infections). EPO contains three complex type N-glycans located on Asn residues at position 24, 38, and 83, and an O-glycosylation site at position 126 and has a maximum of 14 sialic acids per molecule.<sup>47</sup> These terminal sialic acids determine the biological activity of EPO.<sup>47</sup> Less sialylated or nonsialylated EPO has dramatically decreased *in vivo* activity compared to sialylated EPO. Interestingly, mutated and nonsialylated EPO has strong *in vitro* activity, indicating the importance to the asialo glycoprotein receptor system.<sup>48</sup> Application of 10 mM ManNAc to EPO-producing CHO-cells led to increased and more homogenous sialylation as demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis.<sup>49</sup>

However, although ManNAc supplementation does increase the intracellular sialic acid pool dramatically,<sup>49</sup> ManNAc-application does not automatically lead to an increase of sialylation of the product. This was shown for NS0 cells producing a recombinant humanized IgG1<sup>50</sup> and to CHO- or NS0-cells producing TIMP-I.<sup>51</sup> In addition, there exist first reports in the literature that ManNAc application influences cell proliferation and differentiation.<sup>52</sup> Finally, from a manufacturer point of view, ManNAc is an expensive supplement, which has to be used in very high concentration during the fermentation process. Furthermore, the distribution of ManNAc and the process lead-through is difficult to control. Therefore, ManNAc application is not first choice to

increase intracellular sialic acid concentrations in a large-scale production process.

### Overexpression of Enzymes Involved in the Biosynthesis of Glycans

CHO-cells are widely employed to produce glycosylated recombinant glycoproteins. However, CHO-cells do not express  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase<sup>53</sup> and therefore cannot produce glycoproteins similar to human glycoproteins that are characterized by both  $\alpha$ 2,6- and  $\alpha$ 2,3-linked terminal sialic acid residues.<sup>54</sup> Several approaches have been performed to enhance the sialylation machinery of CHO-cells. Coexpression of 2,3-sialyltransferase together with CMP-sialic acid synthase did not further increase sialylation, although a further increase in the intracellular pool of CMP-sialic acid was measured. As explanation, it was postulated that the transport capacity of CMP-sialic acid into the Golgi lumen was limited, thereby causing the reduced availability of CMP-sialic acid substrate for sialylation<sup>55</sup> and be responsible for the lack of (further) increase in sialylation of the recombinant protein. As CMP-sialic acid transport affects the availability of CMP-sialic acid substrate in the Golgi, in addition the CMP-sialic acid transporter was over-expressed. The result was increased sialylation of EPO.<sup>55</sup> Similar results were obtained in CHO-cells producing recombinant human interferon gamma (CHO IFN- $\gamma$ ).<sup>56</sup> Using this approach it could be demonstrated that over-expression of the CMP-sialic acid transporter represents a novel and powerful approach to improve sialylation during recombinant glycoprotein production.<sup>55,56</sup> As described before, terminal sialylation of human proteins is characteristically in  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6 linkage to galactose. Therefore, CHO-cells were stably transfected with human  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase cDNA to increase the sialylation of recombinant glycoproteins.<sup>57,58</sup> Using this approach it could be demonstrated that sialylation and clearance of IFN- $\gamma$  was improved compared to untransfected CHO-cells.<sup>57</sup> However, in one study analyzing the EPO-bioactivity after engineering CHO-cells to express  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase, no significant differences could be detected.<sup>58</sup>

### Over-Expression of GNE

The intention of this approach is trying to enhance the intracellular precursor pools for the biosyn-

thesis of the sialic acids, ManNAc, and thereby increasing sialylation of glycoproteins in the respective eukaryotic cell by the endogenous cellular metabolism. In first line experiments, GNE was over-expressed and it was possible to increase GNE activity in *in vitro* assays.<sup>59</sup> But unfortunately the pool of intracellular sialic acids was not increased.<sup>60</sup> This could be explained by the feedback inhibition of the GNE by activated CMP-sialic acid. To avoid or bypass the feedback inhibition of the epimerase activity of the GNE, a human sialic acid biosynthesis disease could be one way out. Sialuria is a rare human inborn error of the sialic acid metabolism.<sup>34</sup> A defect of the feedback inhibition of the GNE is caused by point mutations within the epimerase domain of GNE (263L, 266Q, 266W) leads to excessive synthesis of sialic acid<sup>34</sup> (see Fig. 1). In several experiments it could be shown that transfection of CHO-cells with sialuria-mutated GNE increases the intracellular pool a sialic acids and consequently increases the sialylation of some model glycoproteins, such as EPO.<sup>49,60</sup>

### Resialylation

Coagulation factor IX produced by CHO-cells exhibited complex-type glycosylation with carbohydrate chains capped with sialic acid in  $\alpha$  2–3 linkage.<sup>61</sup> Human plasma-derived coagulation factor IX contains terminal sialic acid in  $\alpha$  2–6-linkage. Using a strategy of desialylation followed by resialylation with specific sialyltransferases it was possible to convert of CHO-cell-derived sialylation pattern into human-like sialylation pattern *in vitro*.<sup>62</sup> To increase the serum half-life of Etanercept<sup>®</sup>,<sup>63</sup> a recombinant fusion protein, which is used to treat patients suffering from ankylosing spondylitis, juvenile rheumatoid arthritis, psoriasis, psoriatic arthritis or rheumatoid arthritis, a resialylation strategy after expression was developed. Etanercept<sup>®</sup> is a disulfide-linked dimer of a polypeptide composed of the extracellular portion of the human type 2 (p75) tumor necrosis factor receptor (TNFR) fused to the hinge and Fc regions of the human IgG1 heavy chain.<sup>64</sup> This bivalent antibody-like molecule contains two N-glycosylation sites per polypeptide in the receptor domain.<sup>60</sup> The heterogeneous N-linked oligosaccharides of TNFR-IgG fusion protein contain sialic acid, galactose, and N-acetylglucosamine as terminal sugar residues. To increase the level of terminal sialylation,

TNFR-IgG was re-galactosylated and/or re-sialylated using beta-1,4-galactosyltransferase and/or alpha-2,3-sialyltransferase. Treatment of TNFR-IgG with beta-1,4-galactosyl-transferase and UDP-galactose showed that the number of oligosaccharides with terminal *N*-acetylglucosamine residues was significantly decreased with a concomitant increase in the number of terminal galactose residues.<sup>64</sup> Similar treatment of TNFR-IgG with alpha-2,3-sialyltransferase and CMP-sialic acid produced a molecule with an approximately 11% increase in the level of terminal sialylation but still contained oligosaccharides with terminal *N*-acetylglucosamine residues. When TNFR-IgG was treated with a combination of beta-1,4-galactosyltransferase and alpha-2,3-sialyltransferase (either in a single step or in a stepwise fashion), the level of terminal sialylation was increased by approximately 20–23%. These results suggest that *in vitro* galactosylation and sialylation of therapeutic glycoproteins with terminal *N*-acetylglucosamine and galactose residues can be achieved in a single step, and the results are similar to those for the stepwise reaction.<sup>65</sup> This type of *in vitro* glycosylation is suggested to be applicable to other glycoproteins containing terminal *N*-acetylglucosamine and galactose residues and could prove to be useful in increasing the serum half-life and homogeneity of therapeutic glycoproteins. Recently, Hayashi et al.<sup>66</sup> reported the chemical sialylation of TNF- $\alpha$  using an acyl azide method and proofed that also chemical methods can be used to sialylated glycoproteins.

### Inhibition of Sialidases

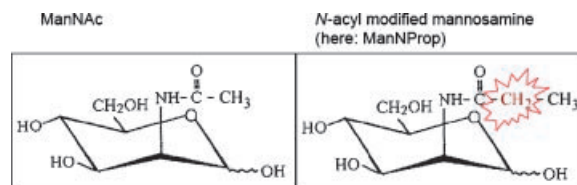
This important issue was interestingly very rarely investigated during the last years. Many cell types including CHO-cells are known to express several sialidases and under standard cell culture conditions, many recombinant glycoproteins lose sialic acid during the course of the fermentation process.<sup>67,68</sup> Rising numbers of dead cells correlates with increasing sialidase activity of CHO-cell culture supernatant, resulting in oligosaccharide desialylation and reduced biological activity of recombinant glycoproteins. Inhibition of sialidase-activity in the supernatant by addition of a substrate analogue to the culture medium<sup>69</sup> or genetic manipulation of sialidase synthesis *via* antisense-RNA<sup>70,71</sup> have already been applied to overcome the desialylation problem in IFN- $\gamma$  expressing CHO-cells.

### Novel Unnatural Sialylation of Glycoproteins

It has been shown that cells take up and efficiently metabolize synthetic *N*-acyl-modified D-mannosamines to the respective *N*-acyl-modified sialic acids *in vitro* and *in vivo*.<sup>72,73</sup> *N*-acyl-modified D-mannosamines successfully employed in this way include *N*-propanoyl- (ManNProp), *N*-butanoyl- (ManNBut-), *N*-pentanoyl- (ManNPent), *N*-hexanoyl- (ManNHex), *N*-crotonoyl- (ManNCrot), *N*-levulinoyl- (ManNLev), *N*-glycolyl- (ManNGc), and *N*-azidoacetyl D-mannosamine (ManNAc-azido) (Fig. 3). All these synthetic, unnatural sialic acid precursors are metabolized by the promiscuous sialic acid biosynthetic pathway in the cytosol and are incorporated into sialoglycoconjugates, where, depending on the cell type, they replace 10–85% of normal, physiological sialic acids (for review: see Ref. 40). This method of introducing novel, nonphysiological sialic acids into glycoconjugates has been termed biochemical engineering of the side chain of sialic acid. As mentioned before the biological half-life time of many glycoproteins is regulated *via* terminal sialic acids. Therefore, it was not unexpected that we found that the half-life of the highly sialylated CEACAM1, a member of the immunoglobulin superfamily, was increased by more than 50% after replacement of the *N*-acetylneuraminic acid by the novel, engineered *N*-propanoylneuraminic acid. This demonstrates that biochemical engineering not only modulates the structure of cell surface sialic acids, but that biochemical engineering also influences biological stability of defined glycoproteins.<sup>74</sup>

### POLYSIALIC ACID IS A PROMISING ANTI-IMMUNOGENIC POLYMER

Polysialic acid represents a homopolymer of alpha 2-8 linked sialic acids.<sup>75</sup> Up to 150 sialic acid



**Figure 3.** Structure of a modified *N*-acyl mannosamine with an elongated *N*-acyl side chain (*N*-propanoyl mannosamine). Note that for example *N*-propanoyl mannosamine contains one CH<sub>2</sub>-group more compared to the physiological human sialic acid precursor ManNAc.

molecules can build polysialic acid.<sup>76</sup> In bacteria, polysialic acid is often used as capsular polysaccharide, including neuroinvasive *Escherichia coli* K1 or *Neisseria meningitidis* group B.<sup>77</sup> Polysialic acid is also uniquely expressed on the neural cell adhesion molecule of mammals.<sup>78</sup> As a consequence, polysialic acid alone, as a complex or a conjugate, is poorly immunogenic.<sup>79</sup> Chemical coupling of a variety of polymers to therapeutic proteins has been studied as a way of improving their pharmacokinetics and pharmacodynamics *in vivo*. Conjugates have been shown to possess greater stability, lower immunogenicity, and a longer blood circulation time due to the chemico-physical properties of these hydrophilic long chain molecules.<sup>80–82</sup> Naturally occurring polysialic acid has been investigated as an alternative to synthetic polymers such as poly(ethylene glycol)<sup>83</sup> due to its lower toxicity and natural metabolism. It has been demonstrated that polysialic acid conjugates to antibodies or their fragments increased biological stability and availability compared to the nonconjugated Fab.<sup>84</sup>

## SUMMARY

Nearly each naturally eukaryotic secreted protein is a glycoprotein<sup>85</sup> and therefore most therapeutic proteins in development are glycoproteins. Sialic acid is a crucial monosaccharide in mammals.<sup>86</sup> Especially in humans, glycans of glycoproteins determine functional properties of the respective protein. This review concentrates on the role of sialic acid and possibilities to increase the content of sialic acid during the production process of recombinant glycoproteins. Glycosylation and sialylation (as one part of the glycosylation) have different consequences on (therapeutic) glycoproteins and therefore one has to distinguish between glycosylation and sialylation. Glycosylation per se has major impact on solubility and resistance to proteolysis of glycoproteins.<sup>87,88</sup> Glycosylation can be achieved by expressing the respective protein in a cell system, which is capable to glycosylate proteins, such as insect cells or mammalian cells like CHO.<sup>89</sup> However, in none of major cell line used for production has the product a human-type of sialylation.<sup>90</sup> However, the biological effect of therapeutics depends often on sialic acids. Terminal sialic acids in the proper linkage on glycoproteins reduce their immunogenicity<sup>12,22</sup> and increase the biological half-life of

respective glycoproteins<sup>20,21</sup> and are therefore not only important, but also a necessity for most therapeutic glycoproteins. It is notable that during the fermentation process of recombinant glycoproteins, sialylation is difficult to control and there is still a need for further improvement homogenous sialylation. In addition the degree of sialylation is important for the batch-to-batch consistency during the fermentation process and approval.

Taken together: The best strategy to generate native sialylation would be producing the respective sialylated glycoprotein in cell lines, which are derived from the original tissue, where the glycoprotein is expressed *in vivo*. Since this is not applicable, there are several strategies to increase and humanize sialylation during the production process of recombinant therapeutic glycoproteins. However, it is difficult to predict a method to yield maximal sialylation. In most cases a combination of more than one strategy seems to be advisable.

## REFERENCES

1. Gillet VJ. 2008. New directions in library design and analysis. *Curr Opin Chem Biol* 12:372–378.
2. Schnur DM. 2008. Recent trends in library design: 'Rational design' revisited. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11:375–380.
3. Wang M, He M. 2007. The rapid discovery of engineered antibodies. *IDrugs* 10:562–565.
4. Leader B, Baca QJ, Golan DE. 2008. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov* 7:21–39.
5. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473:4–8.
6. Roth J. 2002. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: Relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev* 102:285–303.
7. Mahal LK. 2008. Glycomics: Towards bioinformatic approaches to understanding glycosylation. *Anticancer Agents Med Chem* 8:37–51.
8. Solá RJ, Griebenow K. 2008. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci* [Epub ahead of print].
9. Sinclair AM, Elliott S. 2005. Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 94:1626–1635.
10. Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert HC. 2002. The sugar code: Functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta* 1572:165–177.

11. Kornfeld R, Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631–664.
12. Schauer R. 2000. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 17:485–499.
13. Varki NM, Varki A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: Implications for biology and disease. *Lab Invest* 87:851–857.
14. Schauer R. 1988. Sialic acids as antigenic determinants of complex carbohydrates. *Adv Exp Med Biol* 228:47–72.
15. Padler-Karavani V, Yu H, Cao H, Chokhawala H, Karp F, Varki N, Chen X, Varki A. 2008. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: Potential implications for disease. *Glycobiology* 18:818–830.
16. Varki A. 2001. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol (Suppl 33)*:54–69.
17. Chen S, Gregoire A, Malykh Y, Visvikis A, Monaco L, Shaw L, Schauer R, Marc A, Georgen JL. 2003. Reduction of CMP-N-acetylneuraminic hydroxylase activity in engineered chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy. *Biochim Biophys Acta* 1622:133–144.
18. Byrne B, Donobe GG, O'Kennedy R. 2007. Sialic acids: Carbohydrates moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discov Today* 12:319–326.
19. Varki A. 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 11:248–255.
20. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. 1971. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246:1461–1467.
21. Weiss P, Ashwell G. 1989. The asialoglycoprotein receptor: Properties and modulation by ligand. *Prog Clin Biol Res* 300:169–184.
22. Antonelli G. 1994. Development of neutralizing and binding antibodies to interferon (IFN) in patients undergoing IFN therapy. *Antiviral Res* 24:235–244.
23. Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R. 1990. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem* 188:405–411.
24. Aquino D, Wong R, Margolis RU, Margolis RK. 1980. Sialic acid residues inhibit proteolytic degradation of dopamine beta-hydroxylase. *FEBS Lett* 112:195–198.
25. Lawson EQ, Hedlund BE, Ericson ME, Mood DA, Litman GW, Middaugh R. 1983. Effect of carbohydrate on protein solubility. *Arch Biochem Biophys* 220:572–575.
26. Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W. 1997. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272:24319–24324.
27. Cardini CE, Leloir LF. 1957. Enzymatic formation of acetylgalactosamine. *J Biol Chem* 225:317–324.
28. Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R, Reutter W. 1997. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272:24313–24318.
29. Schauer R, Wember M, do Amaral CF. 1972. Synthesis of CMP-glycosides of radioactive N-acetyl-, N-glycoloyl-, N-acetyl-7-O-acetyl- and N-acetyl-8-O-acetylneuraminic acids by CMP-sialate synthase from bovine submaxillary glands. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 353:883–886.
30. Van Rinsum J, Van Dijk W, Hooghwinkel GJ, Ferwerda W. 1984. Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid-forming enzymes. N-acetylneuraminase-9-phosphate synthase and N-acetylneuraminase 9-phosphatase. *Biochem J* 223:323–328.
31. Jourdain GW, Swanson AL, Watson D, Roseman S. 1964. Isolation of sialic acid 9-phosphatase from human erythrocytes. *J Biol Chem* 239:2714–2716.
32. Kean EL. 1991. Sialic acid activation. *Glycobiology* 1:441–447.
33. Münster-Kühnel AK, Tiralongo J, Krapp S, Weinhold B, Ritz-Sedlacek V, Jacob U, Gerardy-Schahn R. 2004. Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology* 14:43R–51R.
34. Seppala R, Lehto VP, Gahl WA. 1999. Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. *Am J Hum Genet* 64:1563–1569.
35. Gerardy-Schahn R, Oelmann S, Bakker H. 2001. Nucleotide sugar transporters: Biological and functional aspects. *Biochimie* 83:775–782.
36. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83:727–737.
37. Ko K, Ahn MH, Song M, Choo YK, Kim HS, Ko K, Joong H. 2008. Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants. *Mol Cells* 25:494–503.
38. Pels Rijcken WR, Overdijk B, Van den Eijnden DH, Ferwerda W. 1995. The effect of increasing nucleotide-sugar concentrations on the incorporation of sugars into glycoconjugates in rat hepatocytes. *Biochem J* 305:865–870.
39. Kayser H, Geilen CC, Paul C, Zeitler R, Reutter W. 1992. Incorporation of N-acyl-2-amino-2-deoxyhexoses into glycosphingolipids of the pheochromocytoma cell line PC 12. *FEBS Lett* 301:137–140.
40. Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W. 2001. Biochemical engineering of the

- N-acyl side chain of sialic acid: Biological implications. *Glycobiology* 11:11R–18R.
41. Jones MB, Teng H, Rhee JK, Lahar N, Baskaran G, Yarema KJ. 2004. Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated N-acetylmannosamine (ManNAc) analogues to sialic acids. *Biotechnol Bioeng* 85:394–405.
  42. Gu X, Wang DI. 1998. Improvement of interferon-gamma sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol Bioeng* 58:642–648.
  43. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. 2000. Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81:2341–2364.
  44. Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. 1984. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J Biol Chem* 259:6790–6797.
  45. Curling EM, Hayter PM, Baines AJ, Bull AT, Gull K, Strange PG, Jenkins N. 1990. Recombinant human interferon-gamma. Differences in glycosylation and proteolytic processing lead to heterogeneity in batch culture. *Biochem J* 272:333–337.
  46. Debeljak N, Sytkowski AJ. 2008. Erythropoietin: New approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des* 14:1302–1310.
  47. Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliott S. 1992. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* 31:9871–9876.
  48. Narhi LO, Arakawa T, Aoki K, Wen J, Elliott S, Boone T, Cheetham J. 2001. Asn to Lys mutations at three sites which are N-glycosylated in the mammalian protein decrease the aggregation of Escherichia coli-derived erythropoietin. *Protein Eng* 14:135–140.
  49. Bork K, Reutter W, Weidemann W, Horstkorte R. 2007. Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells. *FEBS Lett* 581:4195–4198.
  50. Hills AE, Patel A, Boyd P, James DC. 2001. Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng* 75:239–251.
  51. Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC. 2001. Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 73:188–202.
  52. Kontou M, Bauer C, Reutter W, Horstkorte R. 2008. Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells. *Glycoconj J* 25:237–244.
  53. Lee EU, Roth J, Paulson JC. 1989. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem* 264:13848–13855.
  54. Jenkins N, Parekh RB, James DC. 1996. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 14:975–981.
  55. Jeong YT, Choi O, Son YD, Park SY, Kim JH. 2008. Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in genetically engineered CHO cells. *Biotechnol Appl Biochem* [Epub ahead of print].
  56. Wong NS, Yap MG, Wang DI. 2006. Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP-sialic acid transporter over expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 93:1005–1016.
  57. Bragonzi A, Distefano G, Buckberry LD, Acerbis G, Foglieni C, Lamotte D, Campi G, Marc A, Soria MR, Jenkins N, Monaco L. 2000. A new Chinese hamster ovary cell line expressing alpha2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1474:273–282.
  58. Zhang X, Lok SH, Kon OL. 1998. Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: Functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta* 1425:441–452.
  59. Effertz K, Hinderlich S, Reutter W. 1999. Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments. *J Biol Chem* 274:28771–28778.
  60. Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R, Horstkorte R. 2005. The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* 579:5079–5083.
  61. Harrison S, Adamson S, Bonam D, Brodeur S, Charlebois T, Clancy B, Costigan R, Drapeau D, Hamilton M, Hanley K, Kelley B, Knight A, Leonard M, McCarthy M, Oakes P, Sterl K, Switzer M, Walsh R, Foster W. 1998. The manufacturing process for recombinant factor IX. *Semin Hematol* 35:4–10.
  62. Fischer BE, Dorner F. 1998. Recombinant coagulation factor IX: Glycosylation analysis and in vitro conversion into human-like sialylation pattern. *Thromb Res* 89:147–150.
  63. Ducharme E, Weinberg JM. 2008. Etanercept. *Expert Opin Biol Ther* 8:491–502.
  64. Ashkenazi A, Marsters SA, Capon DJ, Chamow SM, Figari IS, Pennica D, Goeddel DV, Palladino MA, Smith DH. 1991. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10535–10539.
  65. Raju TS, Briggs JB, Chamow SM, Winkler ME, Jones AJ. 2001. Glycoengineering of therapeutic

- glycoproteins: In vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. *Biochemistry* 40: 8868–8876.
66. Hayashi A, Chiba T, Hayashi H, Sasayama S, Ishiguro T, Onozaki K. 2007. Synthesis of glycosylated human tumor necrosis factor alpha coupled with N-acetylneuraminic acid. *Cancer Immunol Immunother* 56:545–553.
  67. Munzert E, Heidemann R, Büntemeyer H, Lehmann J, Muthing J. 1997. Production of recombinant human antithrombin III on 20-L bioreactor scale: Correlation of supernatant neuraminidase activity, desialylation, and decrease of biological activity of recombinant glycoprotein. *Biotechnol Bioeng* 56:441–448.
  68. Munzert E, Muthing J, Büntemeyer H, Lehmann J. 1996. Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effects on recombinant human antithrombin III integrity. *Biotechnol Prog* 12:559–563.
  69. Gramer MJ, Gooch CF, Chock VY, Brousseau DT, Sliwkowski MB. 1995. Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Biotechnology (NY)* 13:692–698.
  70. Ferrari J, Gunson J, Lofgren J, Krummen L, Warner TG. 1998. Chinese hamster ovary cells with constitutively expressed sialidase antisense RNA produce recombinant DNase in batch culture with increased sialic acid. *Biotechnol Bioeng* 60:589–595.
  71. Ngantung FA, Miller PG, Brushett FR, Tang GL, Wang DI. 2006. RNA interference of sialidase improves glycoprotein sialic acid content consistency. *Biotechnol Bioeng* 95:106–119.
  72. Kayser H, Ats C, Lehmann J, Reutter W. 1993. New amino sugar analogues are incorporated at different rates into glycoproteins of mouse organs. *Experientia* 49:885–887.
  73. Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R, Reutter W. 1992. Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem* 267:16934–16938.
  74. Horstkorte R, Lee HY, Lucka L, Danker K, Mantey L, Reutter W. 2001. Biochemical engineering of the side chain of sialic acids increases the biological stability of the highly sialylated cell adhesion molecule CEACAM1. *Biochem Biophys Res Commun* 283:31–35.
  75. Finne J, Leinonen M, Mäkelä PH. 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 2:355–357.
  76. Inoue S, Inoue Y. 2001. Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *J Biol Chem* 276:31863.
  77. Jennings HJ. 1988. Chemically modified capsular polysaccharides as vaccines. *Adv Exp Med Biol* 228: 495–550.
  78. Rutishauser U. 2008. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9:26–35.
  79. Devi SJ, Robbins JB, Schneerson R. 1991. Antibodies to poly[(2—8)-alpha-N-acetylneuraminic acid] and poly[(2—9)-alpha-N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with *Escherichia coli* K92 conjugates: Potential vaccines for groups B and C meningococci and *E. coli* K1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7175–7179.
  80. Gregoriadis G, Fernandes A, Mital M, McCormack B. 2000. Polysialic acids: Potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 57:1964–1969.
  81. Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. 2005. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids. *Int J Pharm* 300:125–130.
  82. Fernandes AI, Gregoriadis G. 1997. Polysialylated asparaginase: Preparation, activity and pharmacokinetics. *Biochim Biophys Acta* 1341:26–34.
  83. Gaberc-Porekar V, Zore I, Podobnik B, Menart V. 2008. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. *Curr Opin Drug Discov Dev* 11:242–250.
  84. Constantinou A, Epenetos AA, Hreczuk-Hirst D, Jain S, Deonarain MP. 2008. Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation. *Bioconjug Chem* 19:643–650.
  85. Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. 1988. Glycobiology. *Annu Rev Biochem* 57:785–838.
  86. Varki A. 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2:25–40.
  87. Werner RG, Kopp K, Schlueter M. 2007. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatr Suppl* 96:17–22.
  88. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25:21–50.
  89. Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. 2004. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj J* 21:343–360.
  90. Grabenhorst E, Schlenke P, Pohl S, Nimtz M, Conradt HS. 1999. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj J* 16:81–97.