

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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -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, β -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 β -glucuronidasa humana recombinante. En una modalidad adicional de ejemplo, la LSD es mucopolisacaridosis tipo 7 (es decir, MPS 7, MPS VII (por sus siglas en inglés) o síndrome de Sly). En algunas modalidades, las β -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 β -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.

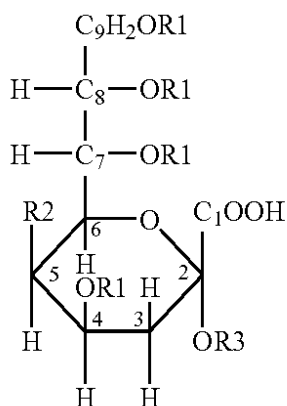
A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o
5 método que se está utilizando para determinar el valor.

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
10 más residuos de azúcar.

Tal como se utiliza en la presente, "GUS" hace referencia a β -glucuronidasa, una glicoproteína de ejemplo, de acuerdo con la presente invención.
15

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 al presente, abarca una familia de
20 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 β -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.

20

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 β -glucuronidasas humanas se muestra
5 mejorado ya que la absorción total de β -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 β -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 β -
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 β -glucuronidasa, una enzima responsable de catalizar la hidrólisis de los residuos del ácido β -D-glucurónico del extremo no reductor de los mucopolisacáridos. En algunas modalidades, la β -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 β -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 β -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 β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,2 mol/mol de la rhGUS.

20

En algunas modalidades, la β -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 β -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 β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de
5 aproximadamente 0,7 mol/mol a aproximadamente 1,4 mol/mol de la rhGUS. En una modalidad ejemplar, la β -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 β -
10 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
15 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
20 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
 β -glucuronidasa recombinante humana (rhGUS). En algunas
modalidades, al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o 80 % de los
15 residuos de galactosa de la β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 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 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 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 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 β -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 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 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 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 β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) y tiene una 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 β -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 β -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 β -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 β -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 α , interferones γ 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- β , 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 β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS). La β -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
5 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
10 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
15 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
5 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
10 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
20 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

que 10^6 células/mL, 10^7 células/mL, 2×10^7 células/mL, 5×10^7 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 β -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 β -glucuronidasa. En algunas modalidades, la β -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 β -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 β -glucuronidasa humana recombinante de la presente invención se administra en
5 una pauta posológica para el tratamiento de una LSD. En una modalidad, 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 β -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 pauta 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 pauta 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 β -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 β -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 β -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 β -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

Grupo #	Artículo de prueba	Sexo	n	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 ^{era} h: 0,99 2 ^{da} hora: 1,98	n/a	n/a
2	GUS lote: CR01	M	5	iv	0,203	1 ^{era} h: 0,94	~2 ¹	~2 ¹

20

						2 ^{da} hora: 1,87		
	GUS					1 ^{era} h: 0,78		

5

¹La 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 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
10	Infusión rápida	120 min luego del inicio de la infusión
15	Luego de la 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)
		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 β -glucuronidasa como se muestra a continuación: 25 μ 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 μ L de sustrato de 4-MU- β -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 μ L de carbonato de glicina, pH 10,5 y se leyó en una placa de lectura M2^e 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 μ L de cada homogenado para β -glucuronidasa utilizando 4MU- β -glucuronida como se describió previamente. La concentración de proteínas de los homogenados se determinó mediante el método de ácido bicinconínico. Los
5 niveles de β -glucuronidasa en tejido se expresaron como nmoles de 4MU hidrolizado/hr/mg proteína.

Resultados y exposición

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

La **Figura 1** presenta la actividad de la β -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 β -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^{era} 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**). Cmax (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^{da} fase es 1,1 hr y 0,967 hr para GUS lote 43/44 (**Tabla 5**).

Tabla 5.

Grupos	Animal	Cmax (Unidades/ mL)	Tmax (h)	AUC0-t (h*unidades/ mL)	AUC0-inf (h*unidades/ mL)	Semivida (h)	Eliminación (min*unidades/ mL)/(mg/kg)	Vz (Unidades/ mL)/(mg/kg)
Grp 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
Grp 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 β -glucuronidasa y proteínas tal como se describió en los métodos. Los resultados de los ensayos se expresaron como unidades de actividad de β -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 β -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 β -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 β -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^{era} 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 β -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 β -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 /Ensayo	Unidad es	GUS CR01	GUS Lote 43/44	GMP1	GMP2	GMP3*
Título	mg/L	~400	~50	~400	~400	~400
pH	-log [H ⁺]	7,4	7,5	7,4	7,6	6,0
Pureza (Reducción 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) ⁻¹ cm ⁻¹	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 5-21d	20,0 21,6	18,9 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 β -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.