

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 972**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/96** (2006.01)  
**C08L 3/08** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**C12N 9/24** (2006.01)  
**C12N 9/36** (2006.01)  
**C12N 9/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06760588 .1**  
96 Fecha de presentación: **31.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2029740**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Uso de polisacáridos para la estimulación de la actividad enzimática**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.09.2012**

73 Titular/es:  
**GENZYME CORPORATION  
500 KENDALL STREET  
CAMBRIDGE, MA 02142-1108, US**

72 Inventor/es:  
**RISKE, Frank;  
HAYES, Michael y  
LAZARUS, Gary**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 386 972 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de polisacáridos para la estimulación de la actividad enzimática.

## CAMPO DE LA INVENCION

5

**[0001]** Esta descripción se refiere a composiciones y procedimientos para la estimulación de la actividad enzimática mediante el uso de un polisacárido, incluido, pero sin limitarse a hidroxietilalmidón. Además, esta descripción se refiere a procedimientos para la preparación de proteínas, en que los procedimientos implican el uso de enzimas. Además, esta descripción se refiere a procedimientos para la preparación y/o formulación de enzimas y otras biomoléculas.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0002]** Las enzimas tienen utilidad en numerosas aplicaciones industriales. Por ejemplo, las enzimas se usan ampliamente en la industria de los detergentes (por ejemplo, amilasas y proteasas alcalinas bacterianas), la industria de los zumos de frutas y hortalizas (por ejemplo, pectinasas y xilanasas), la industria cárnica (por ejemplo, xilanasas, fitasas,  $\beta$ -glucanasa), la industria del almidón (por ejemplo, amilasas), la industria de la pulpa y el papel (por ejemplo, xilanasas), la industria textil (por ejemplo, celulasas, polifenoxidasas, amilasas, xilanasas y catalasas) y la industria del cuero (por ejemplo, proteasas y lipasas) (Cherry y col., Curr. Opin. Biotechnol. 14: 438 – 443 (2003)).

20

**[0003]** También existe una serie de usos médicos y terapéuticos de enzimas y de los ácidos nucleicos que las codifican, incluido el tratamiento de sustitución enzimática (TSE). En el tratamiento de sustitución enzimática, un paciente que presenta una deficiencia en la actividad de una enzima se trata por administración de la enzima que falta o es disfuncional (una "enzima de TSE"). Las enzimas de TSE son útiles en el tratamiento de numerosas enfermedades. Por ejemplo, ciertos trastornos de almacenamiento lisosómico (TAL) pueden tratarse eficazmente mediante la administración de una enzima de TSE.

25

**[0004]** Otros ejemplos de enzimas de sustitución de importancia médica son la lactasa para la intolerancia a la lactosa y la sustitución de enzimas pancreáticas para el tratamiento de individuos con insuficiencia pancreática, incluida la insuficiencia pancreática debida a fibrosis quística (Wallace y col., Clin. Pharm. 12: 657 – 674 (1993)).

30

**[0005]** Los procedimientos para la estimulación de la actividad enzimática tendrían un valor significativo en numerosas industrias. Con respecto a la preparación de proteínas terapéuticas, en particular aquellas para el uso humano o veterinario, generalmente es deseable el uso de componentes que no son de origen animal (non-ADC). Por lo tanto, existe en particular la necesidad de proporcionar nuevos procedimientos y composiciones para estimular la actividad de enzimas con componentes de origen no animal para diversas aplicaciones.

35

Vrkljan y col., Pharmaceutical Research, vol. 11, n° 7, 1994, páginas 1004 – 1008 describen el efecto de aditivos poliméricos sobre la agregación termoinducida de uroquinasa de bajo peso molecular.

40

## RESUMEN DE LA INVENCION

**[0006]** La presente descripción proporciona una composición que comprende (a) una enzima diana y (b) un polisacárido de origen no natural. La enzima diana puede ser, por ejemplo, una enzima de oligosacáridos/polisacáridos (es decir, una enzima que actúa sobre oligosacárido(s)/polisacárido(s)), una enzima de proteínas (es decir, una enzima que actúa sobre proteína(s), como cinasas, fosforilasas), una enzima de polinucleótidos (es decir, una enzima que actúa sobre polinucleótido(s)) u otras enzimas de importancia industrial o médica, incluidas lipasas y similares. La enzima diana puede estar en disolución o inmovilizada sobre un soporte sólido.

50

**[0007]** En algunos casos, el polisacárido de origen no natural es un almidón modificado. Por ejemplo, el polisacárido de origen no natural puede ser un hidroxialquilalmidón, incluido, pero sin limitarse a hidroxietilalmidón (HES). El polisacárido de origen no natural puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01 al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % p/v.

55

**[0008]** En este documento se describe también una composición que comprende (a) una enzima diana

60

seleccionada del grupo que consta de enzimas de oligosacáridos/polisacáridos, enzimas de proteínas, enzimas de polinucleótidos y otras enzimas de importancia industrial o médica, (b) un polisacárido de origen no natural y (c) un sustrato de la enzima diana, en que la composición comprende de aproximadamente el 0,01 % al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % p/v del polisacárido. El sustrato puede ser, por ejemplo, una proteína, un péptido, un polinucleótido, un nucleótido o una molécula pequeña sustrato de la enzima diana. En algunos casos específicos, el sustrato mismo de la enzima diana es una enzima, incluida, pero sin limitarse a una enzima de TSE, como una hidrolasa lisosómica.

**[0009]** En otros casos específicos, la descripción proporciona una composición en la que la enzima diana es una enzima de escisión de oligosacáridos, el polisacárido es HES y el sustrato es una glucoproteína. En otros casos ilustrativos, la enzima diana es  $\beta$ -glucocerebrosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa, sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -N-hexosaminidasa (por ejemplo,  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa) o laronidasa.

**[0010]** La descripción se dirige también a procedimientos para la estimulación de la actividad enzimática de una enzima diana. En un caso, el procedimiento comprende combinar una enzima diana con de aproximadamente el 0,01 al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % de un polisacárido de origen no natural, con lo que se produce una combinación; y mantener la combinación en condiciones suficientes para estimular la actividad enzimática de la enzima diana.

**[0011]** La descripción también se dirige al uso de un polisacárido de origen no natural para la estimulación no criogénica de la actividad de una enzima en medio líquido, en que la concentración del polisacárido en la composición es de aproximadamente el 0,01 al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 %.

**[0012]** La descripción se dirige además a formulaciones enzimáticas (incluidas formulaciones líquidas y formulaciones reconstituidas) que comprenden un polisacárido de origen no natural.

**[0013]** La descripción se dirige además a composiciones farmacéuticas que comprenden enzimas diana cuya actividad ha sido estimulada por un polisacárido de origen no natural.

Sobre la base de la descripción contenida en este documento, la presente invención proporciona un procedimiento para la estimulación de la actividad enzimática de una enzima diana, en que el procedimiento comprende:

(i) combinar una enzima diana, en que la enzima diana es:

(a) una enzima de oligosacáridos/polisacáridos seleccionada del grupo que consta de: galactosiltransferasa, GalNAc-transferasa, oligosacariiltransferasa, N-acetilglucosaminilfosfotransferasa, O-glucosiltransferasa, N-glucosiltransferasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\beta$ -galactosidasa, sialidasa (neuraminidasa),  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa, N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster- $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa, N-glucanasa (N-glucosidasa F), O-glucanasa (endo- $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa), endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H, sialato-O-acetiltransferasa, sialato-O-acetiltransferasa y  $\alpha$ -glucosidasa o

(b) una hidrolasa lisosómica seleccionada del grupo que consta de:  $\alpha$ -galactosidasa A, ceramidasa ácida,  $\alpha$ -L-fucosidasa ácida,  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida (GCR),  $\beta$ -galactosidasa ácida, iduronato-2 sulfatasa,  $\alpha$ -L-iduronidasa, galactocerebrosidasa,  $\alpha$ -manosidasa ácida,  $\beta$ -manosidasa ácida, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, N-acetilgalactosamina-6-sulfatosulfatasa,  $\beta$ -galactosidasa ácida, esfingomielinasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida,  $\beta$ -hexosaminidasa B, heparán-N-sulfatasa,  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA:  $\alpha$ -glucosaminido-N-acetiltransferasa, N-acetilglucosaminina-6-sulfatosulfatasa,  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa, sialidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa A;

con de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 50 % p/v de un hidroxialquilalmidón y con un sustrato de la enzima diana, con lo que se produce una combinación; y

- 5 (ii) mantener la combinación en condiciones suficientes para estimular la actividad enzimática de la enzima diana, en que las condiciones son entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 40 °C.

Otros aspectos y realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

- 10 **[0014]** Ni lo anterior ni la descripción detallada a continuación, así como ninguno de los ejemplos proporcionados son limitantes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 **[0015]** La figura 1 muestra la estructura polimérica del hidroxietilalmidón (HES). El HES es un polímero de D-glucosa; las unidades del monosacárido están conectadas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y por enlaces de ramificación  $\alpha$ -1,6 que se presentan aproximadamente cada veinte unidades monoméricas.

- 20 **[0016]** La figura 2 muestra un proceso de remodelación de oligosacáridos para la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCR) mediante el tratamiento con sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa (véase, por ejemplo, Furbish y col., Biochim. Biophys. Acta 673: 425 – 434 (1981)).

- 25 **[0017]** La figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra un caso de los procedimientos de la descripción, en que la actividad de la enzima diana se estimula por un polisacárido de la descripción.

- [0018]** La figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra un caso de los procedimientos de la descripción / una realización de los procedimientos de la invención, en que la enzima diana está en disolución y el sustrato está inmovilizado sobre un soporte sólido.

- 30 **[0019]** La figura 5 es un diagrama de flujo que ilustra un caso de los procedimientos de la descripción / una realización de los procedimientos de la invención, en que la enzima diana y el sustrato están en disolución.

- [0020]** La figura 6 es un diagrama de flujo que ilustra un caso de los procedimientos de la descripción / una realización de los procedimientos de la invención, en que la enzima diana está inmovilizada sobre un soporte sólido y el sustrato está en disolución.

- [0021]** La figura 7 es una gráfica de las horas frente al % de la actividad original que ilustra el efecto del HES en la estimulación de la estabilidad de la rGCR.

- 40 **[0022]** La figura 8 es una gráfica de los días frente al % de la actividad original que ilustra el efecto del HES en la estimulación de la estabilidad de la  $\alpha$ -glucosidasa.

- [0023]** La figura 9 es una gráfica del efecto del HES en la estimulación de la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa.

#### 45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- [0024]** Existe la necesidad de proporcionar nuevos procedimientos y composiciones para estimular la actividad de enzimas diana, en particular con componentes de origen no animal (non-ADC), y permitir así un uso más eficiente de las enzimas diana para diversas aplicaciones.

- 50 **[0025]** En la actualidad se están desarrollando aproximadamente 400 proteínas terapéuticas, incluidas enzimas terapéuticas y anticuerpos monoclonales, para el tratamiento de enfermedades humanas (Zopf y col., Pharmaceutical Visions 10 – 14 (primavera 2012)). En algunos casos, la preparación de proteínas terapéuticas puede implicar la modificación enzimática de la proteína terapéutica misma, lo que incluye, pero no se limita a la remodelación de oligosacáridos, durante el proceso de preparación. En otros casos, la proteína terapéutica misma es una enzima.

- [0026]** Las modificaciones como la remodelación de oligosacáridos pueden ser deseables para una actividad óptima de ciertas proteínas terapéuticas. Por ejemplo, la imiglucerasa (el principio activo en Cerezyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EE. UU.) es una  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana con oligosacáridos modificados (conocida también como GCR,  $\beta$ -glucocerebrosida ácida,  $\beta$ -glucosidasa ácida, glucosilceramidasa,  $\beta$ -D-glucosil-N-

acilesfingosinaglucohidrolasa, EC 3.2.1.45) preparada mediante el uso de células recombinantes que se usa para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Gaucher, un trastorno genético raro y devastador causado por una deficiencia o mal funcionamiento de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. La imiglucerasa sufre una remodelación de oligosacáridos durante su preparación: los complejos oligosacáridos unidos a N se someten a enzimas de remodeladoras de oligosacáridos con el fin de exponer restos de manosa centrales para su reconocimiento por receptores de manosa en la membrana plasmática de los macrófagos, lo que permite una endocitosis de la GCR modificada y su suministro a los lisosomas de los macrófagos de manera más eficaz (véase, por ejemplo, Furbish y col., *Biochim. Biophys. Acta* 673: 425 – 434 (1981)).

10 **[0027]** La presente descripción proporciona procedimientos y composiciones para estimular la actividad enzimática de una enzima diana mediante la combinación de la enzima diana con un polisacárido de la descripción. Además, la presente descripción proporciona procedimientos y composiciones para la estimulación no criogénica de la actividad enzimática de una enzima diana mediante la combinación de la enzima diana en medio líquido (por ejemplo, en disolución o inmovilizada sobre un soporte sólido) con un polisacárido de la descripción. Sin limitación en cuanto al mecanismo, el(los) polisacárido(s) de la descripción puede(n) “estimular” la actividad enzimática por aumento de la actividad específica de la enzima diana, por prolongación de la actividad de la enzima diana o por reducción de la desnaturalización, degradación o agregación de la enzima diana y/o estabilización de la enzima diana. Así, por ejemplo, en ciertos casos de la descripción, el uso de un polisacárido de origen no natural de acuerdo con los procedimientos de la descripción permite el uso de una cantidad menor de la enzima diana *in vivo* o en una reacción enzimática *in vitro*, en comparación con el uso en ausencia del polisacárido. La actividad enzimática y las reacciones enzimáticas pueden medirse por procedimientos estándar en la técnica (véase, por ejemplo, Eisenthal y col., *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, EE. UU., 2002).

25 **[0028]** En este documento se ha demostrado que las enzimas diana se estabilizan por la presencia de HES. También se ha demostrado que el HES estimula la actividad enzimática de las enzimas diana, disminuye la cantidad de enzima diana necesaria para llevar a cabo la modificación del sustrato y amplía el intervalo de pH en el que puede usarse una enzima diana. También se ha demostrado que HES es compatible con diversas enzimas diana y diversas concentraciones de enzimas diana; el HES obtenido de fuentes comerciales diferentes es comparable en cuanto a la estimulación de la actividad de las enzimas diana; y la estimulación por HES de la actividad de las enzimas diana es eficaz en un amplio intervalo de volúmenes del sistema.

#### Enzimas diana

35 **[0029]** Los procedimientos de la descripción, incluidos los de la invención, pueden aplicarse ampliamente para estimular la actividad enzimática de enzimas diana. Según se usa en este documento, el término “enzima diana” se refiere a una enzima cuya actividad será o ha sido estimulada por exposición a un polisacárido de origen no natural de acuerdo con los procedimientos de esta descripción. Sin embargo, de la definición del término “enzima diana” se excluyen específicamente la sangre entera, el plasma sanguíneo, el activador del plasminógeno tisular, interleucinas, toxinas, interferones, la proteína C,  $\gamma$ -globulinas y colágenos. En los procedimientos y composiciones de la descripción pueden usarse una o más enzimas diana conjuntamente. Siempre que se use el término “enzima diana”, deberá apreciarse que este término abarca una o más enzimas. En ciertos aspectos de la descripción, por ejemplo, en ciertos aspectos de la invención, la enzima diana se aísla o purifica.

45 **[0030]** En algunos casos, la enzima diana puede ser una enzima de importancia industrial como, por ejemplo, acetolactatodescarboxilasa, proteinasa ácida, alcoholdehidrogenasa, proteasa alcalina, aminoacidooxidasa, aminoacilasa, aminopeptidasa,  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, aspártico- $\beta$ -descarboxilasa, bromelina, catalasa, celulasa, cloroperoxidasa, ciclodextrinaglicosiltransferasa,  $\beta$ -glucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, dextranasa, dextrinasa, endopeptidasa,  $\alpha$ -galactosidasa, glucoamilasa, glutaminasa, hemicelulasa, histidasa, invertasa, isomerasa, lactasa, liasa, lisozima, naringinasa, oxirreductasa, pectinasa, penicilinacilasa, pepsina, peroxidasa, pululanasa, subtililina o similares.

55 **[0031]** En otros casos, la enzima diana puede ser una enzima de oligosacáridos/polisacáridos que puede afectar al enlace covalente de un oligosacárido o un polisacárido (véase, por ejemplo, la tabla 1). Por ejemplo, una enzima de oligosacáridos/polisacáridos puede ser una glucosiltransferasa o una glucosidasa. En otros casos, la enzima diana es una enzima de proteínas que puede afectar a una proteína o un péptido o a las cadenas laterales de sus aminoácidos, lo que resulta en un cambio molecular en la proteína (véase, por ejemplo, la tabla 2). Por ejemplo, una enzima de proteínas puede ser una proteasa o una fosforilasa. En otros casos, la enzima diana es una enzima de polinucleótidos que puede afectar a un polinucleótido o a un nucleótido, lo que resulta en un cambio molecular en el polinucleótido (véase, por ejemplo, la tabla 3). Por ejemplo, una enzima de polinucleótidos puede ser una ligasa o una endonucleasa. En otros casos, la enzima diana puede efectuar una modificación covalente en una molécula pequeña, como una escisión, adición u otro cambio en dicha molécula, por ejemplo, la glucosaisomerasa

que convierte glucosa en fructosa. Por lo tanto, en ciertos casos, la enzima diana de la invención descrita puede ser una glucosidasa, glucosiltransferasa, cinasa, fosfatasa, fosforilasa, sulfatasa, acetilasa, proteasa, nucleasa o ligasa. Una enzima diana puede actuar *in vivo* o *in vitro* y/o puede actuar sobre un oligosacárido, polisacárido, proteína, péptido, lípido, molécula pequeña o polinucleótido aislado o purificado.

5

Tabla 1: Ejemplos de Enzimas de oligosacáridos/polisacáridos

Enzima de oligosacáridos/polisacáridos
<i>Glucosiltransferasas</i>
Galactosiltransferasa
GalNAc-transferasa
Oligosacariltransferasa
<i>N</i> -acetilglucosaminilfosfotransferasa
<i>O</i> -glucosiltransferasa
<i>N</i> -glucosiltransferasa
<i>Exoglucosidasas</i>
$\alpha$ -manosidasa
$\beta$ -galactosidasa
Sialidasa (neuraminidasa)
$\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa
<i>N</i> -acetilglucosamina-1-fosfodiéster
$\alpha$ - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa
<i>Endoglucosidasas</i>
<i>N</i> -glucanasa ( <i>N</i> -glucosidasa F)
<i>O</i> -glucanasa
(endo- $\alpha$ - <i>N</i> -acetilgalactosaminidasa)
Endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa H
<i>Otras</i>
Sialato- <i>O</i> -acetiltransferasa
Sialato- <i>O</i> -acetilesterasa
$\alpha$ -glucosidasa

Tabla 2: Ejemplos de enzimas de proteínas

10

Enzima de proteínas
Proteasa
Miristoilasa
Desformilasa
Enzima de escisión de metionina <i>N</i> -terminal
Fosforilasa
Enzima acetilante
Enzima formadora de puentes disulfuro
Enzima de palmitoilación
Enzima de hidroxilación
Enzima de carboxilación
Enzima de nitración
Enzima de sulfatación
Enzima de ribosilación de ADP
Desamidasa
<i>N</i> -glucosilasa
<i>O</i> -glucosilasa
Enzima de glucosilfosfoinositolación
Farnesilasa
Geranilgeranilasa
Metilasa
Enzima de amidación
Enzima de ubicuitinación

Tabla 3: Ejemplos de enzimas de polinucleótidos

Enzimas de polinucleótidos
Exorribonucleasa
Endorribonucleasa
Exodesoxirribonucleasa
Endodesoxirribonucleasa
Endonucleasa de restricción (tipos I, II y III)
Topoisomerasa I
Topoisomerasa II
Ligasa

**[0032]** En algunos casos, la enzima diana es una enzima que modifica una proteína terapéutica, es decir, una proteína preparada con el propósito de administrarla a un paciente como agente terapéutico, profiláctico o de diagnóstico. Por ejemplo, la enzima diana puede ser una enzima de oligosacáridos/polisacáridos, incluidas, pero sin limitarse a una glucosidasa o glucosiltransferasa. Algunos ejemplos de glucosidasas incluyen  $\alpha$ -manosidasa, sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa y endo- $\beta$ -galactosidasa. Algunos ejemplos de glucosiltransferasas incluyen  $\alpha$ -1,2-fucosiltransferasa, transferasas de los grupos sanguíneos A y B y las UDP-GalNAc: polipéptido-*N*-acetilgalactosaminiltransferasas. Para otros ejemplos de enzimas modificadoras de azúcares, véanse, por ejemplo, la tabla 1 y Fukuda y col., *Glycobiology: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, EE. UU., 1993; Brooks y col., *Functional and Molecular Glycobiology*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, Reino Unido, 2002. En algunos casos preferidos, por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, la enzima diana es sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y/o  $\beta$ -hexosaminidasa.

**[0033]** En algunos casos, la enzima diana misma es una proteína terapéutica. Por ejemplo, las enzimas diana incluyen específicamente, pero no se limitan a las enzimas de TSE listadas en la tabla 4. Por ejemplo, la enzima diana puede ser  $\beta$ -glucocerebrosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa o  $\alpha$ -glucosidasa. Por ejemplo, según se muestra en los ejemplos 1-3, glucocerebrosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -galactosidasa se estabilizan en presencia de HES.

**[0034]** En algunos casos, la enzima diana puede incluirse en más de una categoría, dependiendo de la aplicación para la que se use dicha enzima diana.

Tabla 4: Ejemplos de TAL y las correspondientes enzimas defectivas o deficientes

Trastorno de almacenamiento lisosómico	Enzima defectiva o deficiente (hidrolasa lisosómica)
Fabry	$\alpha$ -galactosidasa A
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa ácida
Gaucher, tipos 1, 2 y 3	$\beta$ -cerebrosidasa ácida (GCR)
Gangliosidosis $G_{M1}$	$\beta$ -galactosidasa ácida
Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
Hunter-Scheie	$\alpha$ -L-iduronidasa
Krabbe	Galactocerebrosidasa
$\alpha$ -manosidosis	$\alpha$ -manosidasa ácida
$\beta$ -manosidosis	$\beta$ -manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A
Morquio A	<i>N</i> -acetilgalactosamina-6-sulfatosulfatasa
Morquio B	$\beta$ -galactosidasa ácida
Niemann-Pick	Esfingomielinasa ácida
Pompe	$\alpha$ -glucosidasa ácida

Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa B
Sanfilippo A	Heparán- <i>N</i> -sulfatasa
Sanfilippo B	$\alpha$ - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C	Acetil-CoA: $\alpha$ -glucosaminido- <i>N</i> -acetiltransferasa
Sanfilippo D	<i>N</i> -acetilglucosamina-6-sulfatosulfatasa
Schindler-Kanzaki	$\alpha$ - <i>N</i> -acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	Sialidasa
Sly	$\beta$ -glucuronidasa
Tay-Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa A

**[0035]** Los trastornos de almacenamiento lisosómico son una clase de enfermedades genéticas que comprenden más de cuarenta trastornos en relación con una deficiencia en la actividad de hidrolasas lisosómicas. El lisosoma sirve como el principal compartimento degradativo de la célula y contiene varias enzimas necesarias para llevar a cabo esta función. Una rasgo característico de los TAL es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que conduce a la formación de gran cantidad de lisosomas dilatados. Por consiguiente, un TAL puede tratarse mediante la administración de una enzima de TSE correspondiente a la hidrolasa lisosómica defectiva o deficiente que se correlaciona con el TAL concreto.

10 **[0036]** Por ejemplo, según se discute anteriormente, la imiglucerasa (el principio activo de Cerezyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EE. UU.) es una  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana con oligosacáridos modificados (conocida también como GCR,  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida,  $\beta$ -glucosidasa ácida, glucosilceramidasa,  $\beta$ -glucosil-*N*-acilesfingosinaglucohidrolasa, EC 3.2.1.45) preparada mediante el uso de células recombinantes y se usa para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Gaucher, un trastorno genético raro y devastador causado por una deficiencia o mal funcionamiento de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Según se muestra en el ejemplo 1, la  $\beta$ -glucocerebrosidasa se estabiliza por la presencia de un polisacárido de origen no natural como HES.

20 **[0037]** La alglucosidasa  $\alpha$  (conocida también como  $\alpha$ -glucosidasa, alfaglucosidasa o  $\alpha$ -glucosidasa ácida, n° de registro CAS: 420784-05-0, EC 3.2.1.3), el principio activo de Myozyme®, (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EE. UU.) es una enzima de TSE para el tratamiento de la enfermedad de Pompe, una rara y debilitadora enfermedad progresiva, frecuentemente mortal. La enfermedad de Pompe (enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, GSD II, glucogenosis de tipo II, deficiencia de maltasa ácida) es un trastorno hereditario del metabolismo del glucógeno causado por la ausencia o una marcada deficiencia de la enzima lisosómica  $\alpha$ -glucosidasa (GAA). Según se muestra en el ejemplo 2, la  $\alpha$ -glucosidasa se estabiliza en presencia de un polisacárido de origen no natural, como HES.

30 **[0038]** Otro ejemplo de una enzima de TSE es Fabrazyme® (agalsidasa  $\beta$ ), que se usa para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. Las personas con la enfermedad de Fabry carecen o tienen cantidades insuficientes de una enzima esencial denominada  $\alpha$ -galactosidasa A o  $\alpha$ -GAL, que ayuda al cuerpo a degradar una sustancia grasa denominada globotriaosilcerámico (GL-3). Fabrazyme® (agalsidasa  $\beta$ ), un sustituto de la enzima deficiente, actúa como la enzima  $\alpha$ -GAL de origen natural y dirige al GL-3 dentro de la célula. Una vez dentro de la célula, degrada el GL-3 en componentes de menor tamaño que pueden eliminarse de la célula por procesos naturales. Según se muestra en el ejemplo 3, la  $\alpha$ -galactosidasa también se estabiliza por la presencia de un polisacárido de origen no natural como HES.

35 **[0039]** Otro ejemplo más de una enzima de TSE es Aldurazyme® (laronidasa), que se usa para el tratamiento de la mucopolisacaridosis I (MPS I), una rara enfermedad genética autosómica recesiva que afecta a varios sistemas orgánicos y tejidos. La enfermedad está causada por un defecto en el gen que codifica la enzima lisosómica  $\alpha$ -L-iduronidasa. Como resultado de este defecto, las células de las personas con MPS I no pueden producir la enzima o la producen en poca cantidad, lo que resulta en la incapacidad del lisosoma para actuar en la degradación secuencial de ciertos glucosaminoglucanos (GAG), concretamente, sulfato de dermatán y sulfato de heparán.

45 **[0040]** En algunos casos, por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, la enzima diana está en medio líquido, es decir, en un entorno líquido o parcialmente líquido. Una enzima en medio líquido puede estar inmovilizada sobre un soporte sólido o puede estar dispersa, parcialmente disuelta o disuelta en disolución. Una enzima diana está inmovilizada sobre un soporte sólido si está unida covalentemente o no, directa o indirectamente, a un material sólido o semisólido, por ejemplo, una resina. Por ejemplo, la enzima diana puede estar inmovilizada



sobre un soporte sólido, por ejemplo, por adsorción física o por una unión covalente o a través de una interacción con una entidad que está en contacto directo con el soporte sólido. Los soportes sólidos ejemplares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una enzima diana puede estar inmovilizada sobre un soporte sólido por medio de una interacción hidrófoba, una interacción electrostática, una interacción de pseudoafinidad, una reacción 5 antígeno-anticuerpo u otra interacción de afinidad. En casos preferidos, el soporte sólido es insoluble en el medio líquido, acuoso o no, que contiene la enzima diana y el polisacárido (y opcionalmente el sustrato).

**[0041]** En algunos casos, un sustrato de la enzima diana está presente con la enzima diana. El sustrato puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido o puede estar disperso, parcialmente disuelto o disuelto en disolución. El 10 sustrato puede ser, por ejemplo, una proteína, un péptido, un polinucleótido, un nucleótido, un lípido o una molécula pequeña. En algunos casos, el sustrato mismo es una enzima, incluida, pero sin limitarse a una hidrolasa lisosómica como las listadas en la tabla 4. En los casos en los que el sustrato es una enzima, el sustrato puede ser también una enzima diana.

**[0042]** Como es bien conocido en la técnica, las enzimas son típicamente activas a intervalos de pH, temperatura y concentración de sustrato determinados. En algunos casos, por ejemplo, el intervalo de pH para la actividad de una enzima diana de la descripción puede ser de aproximadamente pH 3 a pH 9, pH 3 a pH 6, pH 4 a pH 8, pH 5 a pH 7 o pH 5,5 a pH 6,5. En algunos casos, para enzimas acidófilas, el pH puede ser un pH ácido (por ejemplo, inferior a un pH de aproximadamente 6,5, 5,5, 4,5, 3,5 o 2,5). En otros casos, para enzimas alcalófilas, el 20 pH puede ser un pH básico (por ejemplo, superior a un pH de aproximadamente 7,5, 8,5, 9,5, 10,5 o 11,5). En algunos casos, por ejemplo, el intervalo de temperaturas para una enzima diana de la descripción puede ser de aproximadamente 2 – 50 °C, 10 – 37 °C, 15 – 32 °C o 20 – 30 °C. En algunos casos, para enzimas termófilas, la temperatura es superior a una temperatura de aproximadamente 37 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C, 75 °C o 85 °C. En otros casos, para enzimas mesófilas, la temperatura es de aproximadamente 20 – 40 °C, 25 – 37 °C o 30 – 35 °C. En 25 otros casos más, para enzimas psicrófilas, la temperatura es inferior a una temperatura de aproximadamente 30 °C, 25 °C, 20 °C, 10 °C o 5 °C. En otros casos, por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, por ejemplo, la relación entre enzima y sustrato puede ser de aproximadamente 1: 1.000.000.000, 1: 1.000.000, 1: 100.000, 1: 10.000, 1: 1.000, 1: 100, 1: 10 o 1: 1.

**[0043]** Sin embargo, generalmente se entiende que la cinética enzimática está regida por los principios de la cinética de Michaelis-Menten, véase, por ejemplo, Lehninger Principles of Biochemistry, 3ª edición, David L. Nelson y col., eds., Worth Publishers, NY, NY, EE. UU.

**[0044]** Por consiguiente, mediante el uso de estos principios, un experto en la técnica puede determinar la 35 cinética de una enzima diana por medio de una experimentación sencilla y rutinaria. Adicionalmente, se dispone de información sobre enzimas y sobre nomenclatura en la base de datos de nomenclatura enzimática Swiss-Prot – ExpASY (Expert Protein Analysis System), versión 37, marzo de 2005 y las actualizaciones hasta el 2 de agosto de 2005 < URL: <http://au.expasy.org/enzyme/> >; véase también Bairoch A., The ENZYME database in 2000. Nucleic Acids Res. 28: 304 – 305 (2000). Véase también el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica 40 y Biología Molecular (NC-IUBMB), actualización del 27 de julio de 2005, < URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> >; véase también la versión impresa: Enzyme Nomenclature 1992 [Academic Press, San Diego, California, EE. UU., ISBN 0-12-227164-5, 0-12-227165-3] con el suplemento 1 (1993), el suplemento 2 (1994), el suplemento 3 (1995), el suplemento 4 (1997) y el suplemento 5 (en Eur. J. Biochem. 1994, 223: 1 – 5; Eur. J. Biochem. 1995, 232: 1 – 6; Eur. J. Biochem. 1996, 237: 1 – 5; Eur. J. Biochem. 1997, 250: 1 45 – 6 y Eur. J. Biochem. 1999, 264: 610 – 650; respectivamente).

#### Polisacáridos

**[0045]** Un polisacárido es un polímero de monosacáridos lineal o ramificado, de origen natural o sintético, que 50 comprende dos o más unidades de monosacárido. En ciertos casos, los polisacáridos de la descripción (por ejemplo, en ciertas realizaciones, los polisacáridos que se usan en la invención) comprenden al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 50, 75 o más unidades. En ciertos aspectos de la descripción, por ejemplo, en ciertos aspectos de la invención, las unidades de monosacárido que constituyen un polisacárido no son idénticas. Los productos de la hidrólisis de los polisacáridos y las mezclas de polisacáridos están comprendidos en el término polisacárido según 55 se usa en este documento.

**[0046]** Un polisacárido de origen no natural se refiere a un polisacárido que ha sido modificado con respecto a su estado natural. Es decir, la estructura química y/o la actividad biológica del polisacárido de origen no natural están modificadas en comparación con la estructura química y/o la actividad biológica del polisacárido en su estado natural 60 (antes de la modificación). Por ejemplo, a una molécula de polisacárido se le añaden grupos funcionales hidrófilos para mejorar la solubilidad (por ejemplo, para obtener un polisacárido de origen no natural que es soluble en

disolución acuosa aproximadamente al 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %). Además, a una molécula de polisacárido pueden añadirse grupos funcionales aniónicos o catiónicos. Los procedimientos adecuados para producir un polisacárido de origen no natural (por ejemplo, el uso de calor y/o agentes químicos) son conocidos para los expertos en la técnica.

5

**[0047]** Aunque la mayor parte de la discusión en este documento se refiere a polisacáridos de origen no natural, incluidos, pero sin limitarse a hidroxialquilalmidones modificados o Ficoll®, se aprecia que en las composiciones y procedimientos de la presente descripción pueden usarse polisacáridos de origen natural, incluidos, pero sin limitarse a  $\alpha$ -amilosa, amilopectina o dextrano.

10

**[0048]** En algunos casos, el polisacárido es un almidón de origen no natural, como un almidón modificado químicamente, incluidos, pero sin limitarse a hidroxialquilalmidones (incluido, pero sin limitarse a HES o hidroxipropilalmidón), carboximetilalmidones, dietilaminoetilalmidón, éter de almidón y cloruro de (hidroxipropil)trimetilamonio, cianoetilalmidón, bencilalmidón o acetilalmidón (véanse, por ejemplo, Hjermstad, "Starch Hydroxyethyl Ethers and other Starch Ethers", en: Whistler y col., eds., Industrial Gums, Academic Press, Nueva York, EE. UU., 1973 y Moser, "Hydroxyethylated Starches", en Wurzburg, ed., Modified Starches: Properties and Uses, CRC Press, Boca Ratón, Florida, EE. UU., 1987). En los procedimientos de la presente invención se usa un polisacárido que es un hidroxialquilalmidón.

**[0049]** En ciertos casos de la descripción, por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, el polisacárido es un hidroxialquilalmidón seleccionado del grupo que consta de hidroximetilalmidón, HES, hidroxipropilalmidón e hidroxibutilalmidón.

**[0050]** Las composiciones y procedimientos de la descripción pueden contener o usar de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 55 % (p/v) del polisacárido. En ciertos casos, la concentración del polisacárido puede ser de aproximadamente el 0,01 % al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % p/v. En ciertos casos, la concentración del polisacárido es de al menos el 5 % (p/v). En otros casos, la concentración del polisacárido es (p/v) de al menos el 2 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 9 %, 11 %, 13 %, 15 %, 20 %, 30 % o 40 %, en que la concentración del polisacárido es inferior al 55 % (p/v). A la luz de la descripción en este documento, la concentración concreta del polisacárido que estimula la actividad de una enzima diana concreta puede ser determinada por un experto en la técnica mediante experimentación sencilla y rutinaria.

**[0051]** Como reconocerá un experto en la técnica, el peso molecular promedio ("PMP") del polisacárido de la descripción dependerá del polisacárido que se use en concreto. Sin embargo, generalmente el peso molecular promedio del(los) polisacárido(s) de la descripción puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 20 kDa a 2.600 kDa, 100 kDa a 2.000 kDa, 300 kDa a 1.500 kDa o 400 kDa a 800 kDa. En un caso preferido, por ejemplo, en una realización preferida de la invención, el peso molecular promedio del polisacárido es de aproximadamente 400 kDa a aproximadamente 800 kDa. En otros casos preferidos, por ejemplo, en otra realización preferida de la invención, el peso molecular promedio del polisacárido es de aproximadamente 450 kDa a aproximadamente 800 kDa. En otro caso preferido, por ejemplo, en otra realización preferida de la invención, el peso molecular promedio del polisacárido es de aproximadamente 400 kDa a aproximadamente 750 kDa. Como reconocerá un experto en la técnica, generalmente, un polisacárido de un intervalo de pesos moleculares inferior tendrá mayor solubilidad (p/v, p/p) en comparación con un polímero de mayor peso molecular del mismo polisacárido.

**[0052]** En algunos casos preferidos, por ejemplo, en alguna realización preferida de la invención, el polisacárido es HES. El HES es un polímero que puede prepararse a partir del almidón vegetal amilopectina, un polímero de D-glucosa derivado, por ejemplo, de maíz, patatas o trigo, por hidroxietilación, por ejemplo, por tratamiento con óxido de etileno y un alcóxido metálico, e hidrólisis, por ejemplo, con ácido clorhídrico (véase, p. ej., Hjermstad, "Starch Hydroxyethyl Ethers and other Starch Ethers", en: Whistler y col., eds., Industrial Gums, Academic Press, Nueva York, EE. UU., 1973 y Lutz y col., Acta Anaesthesiol. Belg. 35 (supl.): 21 – 26 (1984). La fórmula estructural del HES se muestra en la figura 1. Sin limitación, las unidades de glucosa del HES están conectadas generalmente por enlaces  $\alpha$ -1,4 y por enlaces de ramificación  $\alpha$ -1,6 que se presentan aproximadamente cada veinte unidades monoméricas. El HES puede obtenerse comercialmente de varias fuentes (véanse los ejemplos en este documento). Una ventaja del HES es que generalmente se considera seguro y no tóxico y está aprobado como aditivo alimentario indirecto y expansor del plasma sanguíneo (véanse, por ejemplo, Moser, "Hydroxyethylated Starches", en Wurzburg, ed., Modified Starches: Properties and Uses, CRC Press, Boca Ratón, Florida, EE. UU., 1987 y Treib y col., Intensive Care Med. 25: 258 – 268 (1999)). El HES tampoco es de origen animal. Por

consiguiente, el HES es especialmente útil en los procedimientos y composiciones de la descripción, por ejemplo, en los procedimientos de la invención, cuando se emplea para la preparación de agentes terapéuticos o de otros agentes para uso humano.

5 **[0053]** El HES puede diferir en su peso molecular y nivel de hidroxietilación. El peso molecular promedio puede indicarse como un peso molecular promedio en número o un peso molecular promedio en peso. El nivel de hidroxilación puede medirse como una relación de sustitución molar ("SM"; el número de grupos hidroxietilo por unidad de glucosa) o como un grado de sustitución ("GS"; la fracción de unidades de glucosa que contienen grupos hidroxietilo). Aunque SM y GS no son idénticos, los términos se intercambian frecuentemente en la bibliografía. Los  
10 SM y GS de una muestra dada son comparables cuando los valores son bajos, pero la SM es mayor que el GS cuando la muestra presenta mayor sustitución. Un HES concreto puede identificarse por su peso molecular promedio en peso (en kDa) y la SM; por ejemplo, un HES puede indicarse como HES 480/0,7, HES 450/0,7, HES 200/0,5 o HES 130/0,4. Para más información véanse, por ejemplo, Thompson, "Hydroxyethyl Starch", en Hennesen, ed., Developments in Biological Standardization vol. 48, S. Karger, Basilea, Suiza; Moser, "Hydroxyethylated Starches",  
15 en Wurzburg, ed., Modified Starches: Properties and Uses, CRC Press, Boca Ratón, Florida, EE. UU., 1987; y Treib y col., Intensive Care Med. 25: 258 – 268 (1999). Las variantes de HES incluyen, pero no se limitan a (en orden creciente de PMP) Tetrastarch<sup>TM</sup>, pentalmidón, hexalmidón y hetalmidón.

**[0054]** En casos preferidos, por ejemplo, en realizaciones preferidas de la invención, el polisacárido es HES  
20 (por ejemplo, HES 480/0,7 o HES 450/0,7). En general, HES tiene un PM promedio en peso (PMP) de aproximadamente 400 – 550 kDa y una SM promedio de aproximadamente 0,7. En ciertos casos, por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 % o más de las moléculas están en el intervalo de 20 kDa a 2.600 kDa. En ciertos casos, por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, la SM es de aproximadamente 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8 o 0,85.

25 **[0055]** En otros casos preferidos adicionales, por ejemplo, en otras realizaciones preferidas de la invención adicionales, el polisacárido tiene una o más de las características siguientes:

- 30 a) el polisacárido es sustancialmente soluble en el medio líquido que contiene la enzima diana;
- b) el polisacárido es sustancialmente soluble en el medio líquido que contiene la enzima diana y un sustrato de tal enzima diana;
- 35 c) el polisacárido no es reactivo con la enzima diana (además de estimular la actividad enzimática);
- d) el polisacárido no es reactivo con el sustrato de la enzima diana (además de estimular la actividad enzimática cuando el sustrato es una enzima diana);
- 40 e) el polisacárido es estable a la temperatura y/o el pH en que la enzima diana es activa o se usa;
- f) el polisacárido no está conjugado con la enzima diana;
- g) el polisacárido no está conjugado con el sustrato de la enzima diana;
- 45 h) el polisacárido no es de origen animal;
- i) el polisacárido comprende al menos dos unidades de monosacárido que no son idénticas;
- j) el polisacárido en combinación con la enzima diana se mantiene en un estado no congelado durante al menos una  
50 porción, preferentemente una porción sustancial, de la estimulación de la actividad enzimática por el polisacárido;
- k) el polisacárido en combinación con la enzima diana (y opcionalmente el sustrato) no se liofiliza durante al menos una porción, preferentemente una porción sustancial, de la estimulación de la actividad enzimática por el polisacárido; y/o
- 55 l) en particular en el caso de una enzima diana que es una proteína terapéutica, el polisacárido no es tóxico para animales ni/o humanos.

60 **[0056]** Según se usa en este documento, "el polisacárido no es reactivo con" una enzima diana o un sustrato incluye, pero no se limita a que no inactiva la enzima diana o el sustrato, no inhibe la enzima diana o el sustrato, no escinde la enzima diana o el sustrato o no degrada la enzima diana ni el sustrato.

Uso de los polisacáridos

- [0057]** La presente descripción proporciona procedimientos para la estimulación de la actividad enzimática de una (o más) enzima diana en un medio líquido con un polisacárido(s). Los procedimientos pueden llevarse a cabo a temperaturas a las que la enzima diana es activa, incluidas, pero sin limitarse a entre aproximadamente: 1 °C y 40 °C, 1 °C y 20 °C, 15 °C y 35 °C, 5 °C y 30 °C, 10 °C y 30 °C o 20 °C y 30 °C. En ciertos casos, por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, los procedimientos se llevan a cabo a temperatura ambiente, es decir, a temperaturas de 25 °C ± aproximadamente 5 °C.
- [0058]** Un caso de un procedimiento de la descripción se muestra en la figura 3. En este caso, una enzima diana y un polisacárido se combinan para formar un cóctel (etapa 1) que después se mantiene durante un periodo de tiempo (etapa 2) suficiente para estimular la actividad de la enzima diana en comparación con la actividad de la enzima diana en ausencia del polisacárido. Opcionalmente, el cóctel puede contener un sustrato para la enzima diana. En el caso opcional, el cóctel puede mantenerse durante la reacción enzimática entre la enzima diana y el sustrato. En tales casos, que incluyen realizaciones de la invención, la enzima diana o el sustrato pueden estar en disolución, inmovilizados sobre un soporte sólido o las dos cosas.
- [0059]** Un caso alternativo de un procedimiento de la descripción, que incluye realizaciones del procedimiento de la invención, se muestra en la figura 4. En este caso, en una realización tal, la actividad de una enzima diana en un medio líquido es estimulada por un polisacárido en presencia de un sustrato, en que el sustrato está inmovilizado sobre un soporte sólido, como una resina empaquetada en una columna. La preparación de un cóctel de la enzima diana (proceso A) incluye la combinación del polisacárido con la enzima diana (etapa 1) para preparar un "cóctel" y el mantenimiento del cóctel hasta su uso (etapa 2). Se prepara una composición del sustrato (proceso C, etapa 9), que se mantiene hasta su uso (etapa 10). Opcionalmente, la columna se equilibra primero (etapa 3) y el sustrato se carga en dicha columna (etapa 4). El cóctel de la enzima diana se añade entonces a la columna (etapa 5) y, opcionalmente, se recicla a través de la columna (etapa 6), lo que permite a la enzima diana modificar el sustrato. Por ejemplo, el cóctel de la enzima diana puede reciclarse a través de la columna durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a aproximadamente: 1 a 240 horas, 1 a 40 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 15 a 30 horas o 19 a 25 horas. Alternativamente, dependiendo de la cinética de la reacción enzimática, el cóctel de la enzima diana puede reciclarse a través de la columna durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a aproximadamente: 1 – 48 horas, 1 – 24 horas, 1 – 12 horas, 1 – 6 horas o 1 – 3 horas o menos de aproximadamente una hora. Una vez alcanzado el nivel de modificación deseado, preferentemente, el cóctel de la enzima diana se lava de la columna y el sustrato modificado se eluye y se recupera. Otras variaciones de este caso/realización se encuentran también dentro del alcance de la descripción o invención, según sea apropiado. Por ejemplo, el proceso A puede eliminarse del caso/realizaciones mostrados en la figura 4 y el polisacárido puede añadirse directamente a la columna antes, después o al mismo tiempo que se añade la enzima diana a la columna. En otros casos/realizaciones, el soporte sólido o resina no está en forma de columna, sino que está, por ejemplo, en forma de lechada, pila u otra forma.
- [0060]** Otro caso de un procedimiento de la descripción, que incluye realizaciones del procedimiento de la invención, se muestra en la figura 5. En este caso/en una realización tal, la actividad enzimática de una enzima diana en disolución es estimulada por un polisacárido en presencia de un sustrato en disolución. En ciertos aspectos, la preparación de un cóctel de la enzima diana (proceso A) incluye la combinación del polisacárido con la enzima diana (etapa 1) y el mantenimiento del cóctel hasta su uso (etapa 2). En el proceso C se prepara una composición del sustrato (etapa 7) y se mantiene hasta su uso (etapa 8). El cóctel de la enzima diana y la composición del sustrato se combinan (proceso B, etapa 3) para preparar una tercera composición que comprende la enzima diana, el polisacárido y el sustrato. La tercera composición se incuba (etapa 4) (en algunos casos/realizaciones, removiendo, con burbujeo o con agitación suave) lo que permite a la enzima diana modificar el sustrato. La tercera composición puede incubarse durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a aproximadamente: 1 a 240 horas, 1 a 40 horas, 40 a 100 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 30 a 60 horas, 15 a 30 horas o 19 a 25 horas. Alternativamente, el cóctel de la enzima diana puede incubarse durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a aproximadamente: 1 – 48 horas, 1 – 24 horas, 1 – 12 horas, 1 – 6 horas o 1 – 3 horas o menos de aproximadamente una hora. Una vez alcanzado el nivel de modificación deseado la enzima diana se separa del sustrato modificado (etapa 5). Opcionalmente, el grado de modificación puede monitorizarse durante el proceso, por ejemplo, mediante la toma de una alícuota de la mezcla de reacción y el análisis del estado de modificación con el uso del procedimiento analítico o ensayo enzimático apropiado (incluidos, pero sin limitarse a FACE o HPLC con marcado con ácido antranílico, HPLC, ELISA o SDS-PAGE).
- [0061]** Otro caso de un procedimiento de la descripción, que incluye realizaciones del procedimiento de la invención se muestra en la figura 6. En este caso/en una realización tal, la actividad de una enzima diana

inmovilizada sobre un soporte sólido, como una resina empaquetada en una columna, es estimulada por un polisacárido en presencia de un sustrato en disolución. La preparación de un cóctel de la enzima diana (proceso A) incluye la combinación del polisacárido con la enzima diana (etapa 1) para preparar un "cóctel" y el mantenimiento de dicho cóctel hasta su uso (etapa 2). Se prepara una composición que comprende el sustrato (proceso C, etapa 9) y se mantiene hasta su uso (etapa 10). Opcionalmente, se equilibra (proceso B, etapa 3) una columna rellena con una resina adecuada (por ejemplo, una resina capaz de retener la(s) enzima(s) diana). El cóctel de la enzima diana se carga en la columna (etapa 4). La composición del sustrato se añade entonces a la columna (etapa 5) y, opcionalmente, se recicla a través de la columna (etapa 6), lo que permite a la enzima diana modificar el sustrato. La composición del sustrato puede reciclarse a través de la columna durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a aproximadamente: 1 a 240 horas, 1 a 40 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 15 a 30 horas o 19 a 25 horas. Alternativamente, dependiendo de la cinética de la reacción enzimática, el sustrato puede reciclarse a través de la columna durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a aproximadamente: 1 a 48 horas, 1 a 24 horas, 1 a 12 horas, 1 a 6 horas y 1 a 3 horas. Alternativamente, el sustrato puede reciclarse a través de la columna durante un periodo de tiempo inferior a aproximadamente una hora. Una vez alcanzado el nivel de modificación deseado se recupera el sustrato modificado (etapa 7). Opcionalmente, también puede recuperarse la enzima diana (etapa 8). Otras variaciones de este caso/realización también se encuentran dentro del alcance de la descripción o la invención, según sea apropiado. Por ejemplo, el proceso A puede eliminarse del caso/realizaciones mostrados en la figura 6 y el polisacárido puede añadirse directamente a la columna antes, después o al mismo tiempo que se añade el sustrato a la columna. En otros casos/realizaciones, el soporte sólido o resina no está en forma de columna, sino que está, por ejemplo, en forma de lechada, pila u otra forma.

**[0062]** En los procedimientos de la presente descripción, el orden en el que se combinan la enzima diana, el polisacárido y, opcionalmente, el sustrato no es crítico. Por lo tanto, en otros casos más de la descripción, por ejemplo, en otras realizaciones más de la invención, la enzima diana, el polisacárido a la composición del sustrato pueden añadirse conjuntamente o el polisacárido puede añadirse a la composición del sustrato antes de la adición de la enzima diana.

**[0063]** Por consiguiente, una ventaja de los procedimientos descritos en este documento es tal que permite el uso de una cantidad reducida de la enzima diana en comparación con la cantidad requerida si no se hubiera estimulado la actividad.

**[0064]** Además, la presente descripción proporciona procedimientos para la estimulación de la actividad enzimática de una enzima diana (por ejemplo, en medio líquido), en que el procedimiento comprende:

(a) la combinación de una enzima diana con un polisacárido de origen no natural y, opcionalmente, un sustrato de la enzima diana; y

(b) el mantenimiento de la combinación preparada en la etapa (a) sin congelar durante un periodo de tiempo: (i) suficiente para estimular la actividad de la enzima diana en comparación con un control adecuado, como la actividad de la enzima diana en ausencia del polisacárido (en comparación con la actividad de una enzima diana que no se ha combinado con el polisacárido de origen no natural); y/o (ii) suficiente para una pérdida sustancial de la actividad de la enzima diana en ausencia del polisacárido. Según se señala en este documento, la actividad enzimática y las reacciones enzimáticas pueden medirse por procedimientos estándar (véanse, por ejemplo, Eisenthal y col., *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, 2002 y las descripciones en los ejemplos).

**[0065]** Los procedimientos de la descripción pueden comprender además:

(c) permitir que la enzima diana modifique el sustrato y produzca un sustrato modificado; y

(d) la recuperación del sustrato modificado.

**[0066]** La descripción se dirige también a composiciones que comprenden sustratos modificados o enzimas diana producidos por los procedimientos descritos en este documento.

**[0067]** Las combinaciones pueden mantenerse en la etapa (b) durante al menos aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 22, 24 o 48 horas o al menos aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 días, pero menos de 90 días. Por ejemplo, las combinaciones pueden mantenerse durante aproximadamente: 1 a 40 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas o 19 a 25 horas. En algunos aspectos, la combinación pueden mantenerse durante aproximadamente: 1 a 90 días, 1 a 45 días, 46 a 90 días, 2 a 60 días, 2 a 30 días, 2 a 15 días o 2 a 7 días.

**[0068]** Según se señala anteriormente, la enzima diana de los procedimientos es este documento puede ser

cualquier enzima, por ejemplo, una enzima de oligosacáridos/polisacáridos, incluidas, pero sin limitarse a aquellas listadas en la tabla 1, una enzima de proteínas, incluidas, pero sin limitarse a aquellas listadas en la tabla 2 o una enzima de polinucleótidos, incluidas, pero sin limitarse a aquellas listadas en la tabla 3, una lipasa, una hidrolasa lisosómica, incluidas, pero sin limitarse a aquellas listadas en la tabla 4 o una enzima de moléculas pequeñas.

5

**[0069]** Como apreciará un experto en la técnica, los sustratos afines para enzimas diana concretas son bien conocidos en la técnica. Generalmente, sin limitación, un sustrato puede ser una proteína, un péptido, un nucleótido, un lípido, un oligonucleótido o una molécula pequeña. Por ejemplo, en algunos casos, el sustrato es una proteína terapéutica. Por ejemplo, en algunos casos preferidos, el sustrato puede ser una enzima de TSE, incluidas, pero sin limitarse a aquellas listadas en la tabla 4. En un caso preferido, por ejemplo, en una realización preferida de la invención (1) las enzimas diana son sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasa; (2) el almidón es HES; y (3) el sustrato es  $\beta$ -glucocerebrosidasa.

10

**[0070]** Además, la descripción proporciona procedimientos para la estimulación de la actividad enzimática de enzimas que modifican oligosacáridos. Por ejemplo, en un caso, el procedimiento comprende combinar una o más enzimas (por ejemplo, enzimas modificadoras de oligosacáridos) que modifican la  $\beta$ -glucocerebrosidasa con de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 % de HES, con lo que se produce una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que se estimula (aumenta) la actividad de una o más enzimas en comparación con un control adecuado (por ejemplo, en comparación con la actividad de una o más enzimas modificadoras de oligosacáridos que no se han combinado con de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 % de HES). El grado de modificación de tales oligosacáridos puede medirse por procedimientos estándar como los procedimientos de HPLC con marcado con ácido antranílico o por electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) (véanse, por ejemplo, Eisenthal y col., *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, 2002 y las descripciones en los ejemplos).

20

25

**[0071]** En un caso específico, el procedimiento comprende:

(a) combinar la  $\beta$ -glucocerebrosidasa con una o más enzimas modificadoras de oligosacáridos y con de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 % de HES, con lo que se produce una combinación; y

30

(b) mantener la combinación en condiciones en las que las enzimas modificadoras de oligosacáridos/polisacáridos modifican la  $\beta$ -glucocerebrosidasa en presencia de HES, con lo que se produce  $\beta$ -glucocerebrosidasa modificada. El procedimiento puede comprender además la recuperación de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa modificada.

35

**[0072]** En algunos casos, la descripción proporciona un procedimiento para la estimulación de la actividad enzimática de una enzima diana durante la preparación de una enzima diana y/o un sustrato, incluidas, pero sin limitarse a una enzima de oligosacáridos/polisacáridos o una hidrolasa lisosómica.

40

**[0073]** Además, la descripción proporciona un procedimiento para estimular la actividad enzimática de una enzima diana durante una o más etapas de purificación de la enzima diana o el sustrato. En la técnica se conocen una serie de etapas de purificación (véanse, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3<sup>a</sup> edición, Springer-Verlag, Nueva York, EE. UU., 1994; Abelson y col., *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Nueva York, EE. UU., 1990; Roe, *Protein Purification Techniques: A Practical Approach*, 2<sup>a</sup> edición, Oxford University Press, Nueva York, EE. UU., 2001). La pureza puede evaluarse por cualquier procedimiento adecuado, incluidos, pero sin limitarse a SDS-PAGE, electroforesis capilar o HPLC.

45

**[0074]** En un caso particular, la descripción se dirige a un procedimiento para la estimulación de la actividad enzimática de una o más enzimas (por ejemplo, enzimas de oligosacáridos/polisacáridos) que modifican la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Por ejemplo, los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para estimular la actividad enzimática de la sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y/o  $\beta$ -hexosaminidasa durante la purificación de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (por ejemplo, a partir de células recombinantes). En este caso, el procedimiento comprende combinar la  $\beta$ -glucocerebrosidasa; una enzima de oligosacáridos/polisacáridos seleccionada del grupo que consta de sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa y una combinación de estas; y de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 % de HES, con lo que se produce una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que se estimula la actividad enzimática de la sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y/o  $\beta$ -hexosaminidasa (por ejemplo, en comparación con un control adecuado) y en las que las enzimas modifican la  $\beta$ -glucocerebrosidasa en presencia de HES. De este modo se produce  $\beta$ -glucocerebrosidasa modificada y el procedimiento puede comprender además la recuperación de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa modificada.

50

55

60

**[0075]** Los procedimientos descritos en este documento pueden usarse también para estabilizar la enzima diana para que pueda actuar sobre un sustrato y comprenden combinar el sustrato, una enzima diana que remodela

el sustrato y de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 55 % p/v de un polisacárido de origen no natural, con lo que se produce una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que se produce la alteración enzimática del sustrato por la enzima diana en presencia del polisacárido de origen no natural. En un caso concreto, la descripción proporciona un procedimiento para la alteración enzimática de un oligosacárido de un sustrato (por ejemplo,  $\beta$ -glucocerebrosidasas) por una enzima de oligosacáridos/polisacáridos (por ejemplo, sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y/o  $\beta$ -hexosaminidasa) que comprende combinar el sustrato, la enzima y de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 15 % p/v de un polisacárido de origen no natural, con lo que se produce una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que se produce la remodelación del sustrato por la enzima en presencia del polisacárido de origen no natural.

10

#### Composiciones adicionales

**[0076]** La presente descripción proporciona también una composición que comprende (a) una enzima diana seleccionada del grupo que consta de una enzima de oligosacáridos/polisacáridos, una enzima de proteínas una enzima de polinucleótidos, una lipasa, una cinasa y una hidrolasa lisosómica y (b) un polisacárido de origen natural, en que la composición comprende de aproximadamente el 0,01 % al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % del polisacárido. En algunos casos, la enzima diana misma es una proteína terapéutica.

**[0077]** La presente descripción proporciona además una composición que comprende (a) una enzima diana purificada, (b) un polisacárido de origen no natural y (c) un sustrato de la enzima, en que la composición comprende de aproximadamente el 0,01 % al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % p/v del polisacárido.

**[0078]** La presente descripción proporciona además una composición que comprende (a) una o más enzimas de oligosacáridos/polisacáridos y (b) de aproximadamente el 0,01 % al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % p/v de HES. La enzima de oligosacáridos/polisacáridos se mantiene en presencia de HES y la actividad de dicha enzima de oligosacáridos/polisacáridos se mide en el tiempo mediante la toma de muestras y la determinación de la actividad enzimática frente a un sustrato apropiado. En otro caso, la descripción proporciona una composición que comprende (a) una o más enzimas de oligosacáridos/polisacáridos y (b) de aproximadamente el 0,01 % al 55 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 50 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 10 % al 40 % p/v, de aproximadamente el 15 % al 35 % p/v, de aproximadamente el 20 % al 30 % p/v, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 15 % p/v, de aproximadamente el 0,1 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 1 % al 10 % p/v, de aproximadamente el 5 % al 15 % p/v, de aproximadamente el 3 % al 7 % p/v o de aproximadamente el 4 % al 6 % p/v de HES y (c) un sustrato de la enzima.

**[0079]** Otras combinaciones adicionales ilustrativas no limitantes se muestran en la tabla 5.

50

Tabla 5: Combinaciones ilustrativas

Enzima diana	Polisacárido	Sustrato presente
Cualquiera	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
Cualquiera	Hidroxialquilalmidón	Sí
Cualquiera	HES	Sí
Una enzima modificadora de azúcares	Cualquiera	Sí
Una enzima modificadora de azúcares	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
Una enzima modificadora de azúcares	Hidroxialquilalmidón	Sí
Una enzima modificadora de azúcares	HES	Sí
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	Cualquiera	Sí
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	Hidroxialquilalmidón	Sí
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	HES	Sí
Una hidrolasa lisosómica	Cualquiera	Sí
Una hidrolasa lisosómica	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
Una hidrolasa lisosómica	Hidroxialquilalmidón	Sí
Una hidrolasa lisosómica	HES	Sí
$\beta$ -glucocerebrosidasa	Cualquiera	Sí
$\beta$ -glucocerebrosidasa	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
$\beta$ -glucocerebrosidasa	Hidroxialquilalmidón	Sí
$\beta$ -glucocerebrosidasa	HES	Sí
$\alpha$ -glucosidasa	Cualquiera	Sí
$\alpha$ -glucosidasa	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
$\alpha$ -glucosidasa	Hidroxialquilalmidón	Sí
$\alpha$ -glucosidasa	HES	Sí
Agalsidasa $\beta$	Cualquiera	Sí
Agalsidasa $\beta$	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	Sí
Agalsidasa $\beta$	Hidroxialquilalmidón	Sí
Agalsidasa $\beta$	HES	Sí
Cualquiera	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	No
Cualquiera	Hidroxialquilalmidón	No
Cualquiera	HES	No
Una enzima modificadora de azúcares	Cualquiera	No
Una enzima modificadora de azúcares	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	No
Una enzima modificadora de azúcares	Hidroxialquilalmidón	No
Una enzima modificadora de azúcares	HES	No
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	Cualquiera	No
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	Un almidón modificado químicamente o Ficoll®	No
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	Hidroxialquilalmidón	No
Sialidasa, $\beta$ -galactosidasa o $\beta$ - <i>N</i> -acetilhexosaminidasa	HES	No
Una hidrolasa lisosómica	Cualquiera	No



Una hidrolasa lisosómica	Un almidón modificado químicamente o Ficol®	No
Una hidrolasa lisosómica	Hidroxialquilalmidón	No
Una hidrolasa lisosómica	HES	No
β-glucocerebrosidasa	Cualquiera	No
β-glucocerebrosidasa	Un almidón modificado químicamente o Ficol®	No
β-glucocerebrosidasa	Hidroxialquilalmidón	No
β-glucocerebrosidasa	HES	No
α-glucosidasa	Cualquiera	No
α-glucosidasa	Un almidón modificado químicamente o Ficol®	No
α-glucosidasa	Hidroxialquilalmidón	No
α-glucosidasa	HES	No
Agalsidasa β	Cualquiera	No
Agalsidasa β	Un almidón modificado químicamente o Ficol®	No
Agalsidasa β	Hidroxialquilalmidón	No
Agalsidasa β	HES	No

**[0080]** La descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende una enzima diana y un polisacárido de origen no natural, en que la composición comprende de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 55 % p/v del polisacárido. En otro caso, la composición farmacéutica comprende sustratos que pueden ser en sí mismos enzimas, incluidas hidrolasas lisosómicas producidas de acuerdo con tales procedimientos y procedimientos de uso las mismas. En casos ilustrativos, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden hidrolasas lisosómicas, incluida, por ejemplo, β-glucocerebrosidasa, producidas de acuerdo con los procedimientos de la invención. Las formulaciones y excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos (véanse, por ejemplo, 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare, Montvale, NJ, EE. UU., 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Gennado y col., eds. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA, EE. UU., 2000; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición, Rowe, R. y col., 2005; Kibbe, A.H. (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, Washington, D.C., EE. UU., American Pharmaceutical Association; M.F. Powell y col., PDA Journal of Pharm. Sci. Tech. 52: 238 – 311 (1998); S. Neema y col., Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, J. Swarbrick y J.C. Boylan eds., M. Dekker (2002)).

**[0081]** Las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen opcionalmente uno o más vehículos, diluyentes, excipientes, cargas y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, lactosa, celulosa, dextrosa), que son "aceptables" en el sentido de que son compatibles con otros ingredientes de la composición farmacéutica y no son perjudiciales para la composición ni para el receptor de la composición. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan mediante la asociación de la enzima diana, el polisacárido de origen no natural y/o el sustrato con el vehículo, diluyente, excipiente, carga y/o estabilizante y, después, si es necesario, el reparto del producto en dosis unitarias del mismo.

**[0082]** Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, como un sobre, lechada, pastilla, elixir, suspensión, líquido o comprimido. En casos concretos, las composiciones farmacéuticas se formulan para inyección. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se formulan para inyectables líquidos (vial, jeringa precargada), inyectables liofilizados (vial, jeringa de cámara doble), administración por inhalación (micropartículas, nebulizado), formulaciones de liberación prolongada por vía oral e inyectables, colirios y/o administración por vía intranasal (líquido). En un caso, la composición farmacéutica comprende la enzima diana y un polisacárido de origen no natural en un vehículo líquido (por ejemplo, agua). Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un conservante farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, alcohol bencílico, fenol). En un caso concreto, la composición farmacéutica comprende una enzima diana que se ha solubilizado o resolubilizado (como la resolubilización de un producto liofilizado) en un líquido que comprende un polisacárido de origen no natural.

**[0083]** Además, la descripción proporciona procedimientos para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico, como un TAL listado en la tabla 4 (por ejemplo, la enfermedad de Gaucher), que comprende la administración de una composición farmacéutica de la descripción a un sujeto con necesidad de ello (por ejemplo, un mamífero, como un humano). La administración no se limita a ningún sistema de administración concreto y puede incluir, sin limitación, la vía intravenosa, parenteral (incluidas la inyección subcutánea, intramedular, intraarticular, intramuscular o intraperitoneal), transdérmica u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos y agentes y dispositivos de liberación prolongada). La administración a un individuo puede tener lugar en una sola dosis o en administraciones repetidas y en cualquiera de las diversas formas de sales fisiológicamente aceptables y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptable como parte de una

composición farmacéutica (descrita en este documento).

**[0084]** Las composiciones en este documento pueden administrarse como una dosis de aproximadamente 1 µg/kg a 80 mg/kg de principio activo, dependiendo de la gravedad de los síntomas y de la evolución de la enfermedad. Alternativamente se administra una dosis de aproximadamente 0,01 unidades por kilogramo de peso corporal del paciente (U/kg) a 1.000 U/kg. Para administrar las composiciones de la descripción puede usarse cualquier procedimiento de administración conocido en la técnica. En el caso más normal, los compuestos proteínicos se administran de manera ambulatoria, diaria, semanal, bisemanal, mensual o bimensualmente. Ciertas composiciones pueden administrarse solo unas pocas veces o solamente una vez. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada de un compuesto es de aproximadamente 1 µg/kg a 80 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a 25 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a 10 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a 1 mg/kg, de aproximadamente 10 µg/kg a 1 mg/kg, de aproximadamente 10 µg/kg a 100 µg/kg, de aproximadamente 100 µg a 1 mg/kg o de aproximadamente 500 µg/kg a 15 mg/kg. Alternativamente, la dosis terapéuticamente eficaz apropiada de una enzima es de aproximadamente 0,1 U/kg a 200 U/kg, de aproximadamente 5 U/kg a 300 U/kg, de aproximadamente 10 U/kg a 100 U/kg, de aproximadamente 100 U/kg a 500 U/kg, de aproximadamente 5 U/kg a 50 U/kg, de aproximadamente 500 U/kg a 2.000 U/kg o de aproximadamente 1.000 U/kg a 2.500 U/kg. Adicionalmente, las dosis específicas se indican en la publicación Physicians' Desk Reference®.

**[0085]** Por ejemplo, en un caso, la β-glucocerebrosidasa producida por los procedimientos de la descripción, por ejemplo, mediante el uso de los procedimientos de la invención, puede administrarse a un sujeto por medio de una infusión intravenosa (IV). Por ejemplo, los regímenes de dosificación iniciales, que pueden ser ajustados por el médico sobre la base de la gravedad de la enfermedad, pueden comprender dosis únicas o múltiples semanales de aproximadamente 1 U/kg a 5 U/kg de peso corporal o dosis aproximadamente bisemanales de aproximadamente 30-100 U/kg de peso corporal, en que una unidad (U) de GCR se define como la cantidad de GCR que cataliza la hidrólisis de 1 µmol de *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido por minuto a 37 °C. Generalmente, la infusión IV se realiza en un espacio de tiempo de 1 – 2 horas.

**[0086]** Por ejemplo, en otro caso, la α-galactosidasa producida por los procedimientos de la descripción, por ejemplo, mediante el uso de los procedimientos de la invención, puede administrarse a un sujeto por medio de una infusión intravenosa (IV). Por ejemplo, los regímenes de dosificación iniciales, que pueden ser ajustados por el médico sobre la base de la gravedad de la enfermedad, pueden comprender dosis únicas o múltiples semanales de aproximadamente 0,3-3,0 mg/kg. Generalmente, la infusión IV se realiza en un espacio de tiempo de 1-2 horas. En relación con la α-galactosidasa, una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 µmol de *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido por minuto a 37 °C.

**[0087]** En otro caso más, la α-glucosidasa producida por los procedimientos de la descripción, por ejemplo, mediante el uso del procedimiento de la invención, puede administrarse a un sujeto por medio de una infusión intravenosa (IV). Por ejemplo, los regímenes de dosificación iniciales, que pueden ser ajustados por el médico sobre la base de la gravedad de la enfermedad, pueden comprender dosis únicas o múltiples semanales de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg en administración bimensual. Generalmente, la infusión IV se realiza en un espacio de tiempo de 4-7 horas. En relación con la α-glucosidasa, una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 µmol de *p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido por minuto a 37 °C.

#### Análisis para evaluar la actividad enzimática de la enzima diana

**[0088]** La actividad enzimática de una enzima diana puede evaluarse mediante un ensayo apropiado determinado por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Eisenthal y col., Enzyme Assays: A Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York, EE. UU. 2002; Freifelder, D., Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2ª edición, W.H. Freeman & Co., Nueva York, EE. UU., 1982 y las descripciones en los ejemplos).

**[0089]** Por ejemplo, el estado de modificación de un sustrato o el alcance de una reacción enzimática que contiene una enzima diana o la actividad de una enzima diana pueden medirse mediante ensayos conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a electroforesis, cromatografía, procedimientos inmunológicos, procedimientos hidrodinámicos, procedimientos espectroscópicos u otros procedimientos), véase, por ejemplo Freifelder, D., Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2ª edición, W.H. Freeman & Co., Nueva York, EE. UU., 1982; véase también Eisenthal y col., Enzyme Assays: A Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York, EE. UU. 2002. En otros casos, por ejemplo, en otras realizaciones de la invención, el grado de modificación puede determinarse durante o después del proceso, por ejemplo, mediante la toma de muestras de la mezcla de reacción y el examen del estado de modificación del sustrato por medio de un procedimiento analítico adecuado (incluidos, pero sin limitarse a FACE, HPLC o SDS-PAGE o un ensayo señalado anteriormente). El

experto en la técnica puede determinar también el ensayo apropiado para usar junto con una enzima diana concreta mediante experimentación sencilla y rutinaria.

### Ejemplos

5

#### Información general:

**[0090]** A menos que se indique lo contrario, en los ejemplos a continuación se usa hidroxietilalmidón (HES) de B. Braun. El HES de B. Braun tiene un peso molecular promedio indicado (PMP) en el intervalo de 450 – 700 kDa, con una sustitución molar (hidroxietílica) (SM) de 0,70 – 0,80. La comparabilidad de dos fuentes adicionales de HES (obtenido de Ajinomoto y Fresenius Kabi) para estimular la actividad de una enzima diana se muestra en el ejemplo 11.

**[0091]** En los ejemplos 1-9 se usan varios lotes de enzimas diana. La actividad de cada una de las disoluciones madre de las tres enzimas diana (sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa) se midió según se describe a continuación. A partir de esta medida se calcularon las unidades (U) de cada una de las tres enzimas diana añadidas para la reacción con los oligosacáridos/polisacáridos de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCR). En estos ejemplos, la GCR sirve como sustrato enzimático para las enzimas de oligosacáridos/polisacáridos (es decir, las enzimas diana): sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa.

20

#### Ensayo FACE

**[0092]** El ensayo de electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) (véanse, por ejemplo, Jackson, Biochem. Soc. Trans. 21: 121 – 5 (1993); Hu, J., Chromatogr. A 705: 89 – 103 (1995); Friedman y col., Anal. Biochem. 228: 221 – 225 (1995); Starr y col., J. Chromatogr. A 720: 295 – 321 (1996)) es un ensayo estándar para la caracterización y medición de oligosacáridos. También puede usarse para la caracterización de monosacáridos (Gao y col., Glycobiology 13: 1G – 3G (2003)).

**[0093]** En ensayo FACE es un procedimiento preferido para monitorizar la actividad enzimática de las enzimas de oligosacáridos/polisacáridos (como las enzimas diana en algunos ejemplos en este documento) mediante la determinación del grado de modificación de un sustrato (incluidos, pero sin limitarse a una proteína, glucoproteína u oligosacárido) de una enzima(s) diana. Al usar el ensayo FACE, un mayor número de FACE indica un mayor grado de modificación y un mayor grado de actividad de la(s) enzima(s) diana. Los ensayos FACE son conocidos en la técnica.

35

**[0094]** Brevemente, cuando el oligosacárido que se analiza es de una glucoproteína, primeramente se escinde el oligosacárido de la proteína (por ejemplo, por tratamiento con *N*-glucanasa para obtener un *N*-oligosacárido intacto, por tratamiento con *O*-glucanasa para obtener un *O*-oligosacárido intacto o por tratamiento con endo- $\beta$ -acetilglucosaminidasa H para obtener un *N*-oligosacárido del tipo rico en manosa (Turner y col., Glycosylation and Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchors, en Regulatory Protein Modification, Hemmings, ed., Humana Press, Totawa, NJ, EE. UU., 1997).

**[0095]** A continuación, las cadenas de oligosacáridos intactas se marcan con un fluoróforo, como 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfonato de disodio (ANTS), 2-aminoacridona (AMAC), 7-amino-1,3-naftalenodisulfonato de potasio (ANDA) y 4-aminonaftalenosulfonato de sodio (ANSA) por aminación reductiva de una amina primaria del fluoróforo con el extremo reductor de un oligosacárido en presencia de cianoborohidruro de sodio. El fluoróforo puede estar cargado negativamente (por ejemplo, debido a sulfatación, como en los ejemplos no limitantes, que usan ANTS, ANDA, ANSA).

**[0096]** Los oligosacáridos marcados con el fluoróforo se separan después por electroforesis en un gel de alto porcentaje de poliacrilamida. La carga necesaria para la migración en un campo eléctrico la proporciona la estructura química intrínseca del oligosacárido (como, por ejemplo, en oligosacáridos que comprenden ácido siálico o monosacáridos fosforilados o sulfatados) o el fluoróforo.

**[0097]** A continuación se obtiene una imagen del gel resultante mediante un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga, se identifican las diversas bandas y se cuantifica su fluorescencia. Por este procedimiento, pueden cuantificarse los oligosacáridos a concentraciones tan diluidas como en el intervalo de pocos picomoles (Starr y col., J. Chromatogr. A 720: 295 – 321 (1996)).

**[0098]** En los ejemplos en este documento, cuando las enzimas diana fueron sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa, se usó un ensayo FACE para determinar el porcentaje de especies de oligosacárido modificadas

en el sustrato de GCR. Específicamente, la GCR se trató con *N*-glucanasa (aproximadamente 8 U de *N*-glucanasa por 40 µg de GCR) para obtener cadenas intactas de *N*-oligosacáridos. A continuación, los oligosacáridos obtenidos se marcaron con el fluoróforo ANTS (ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico) y se separaron en un gel para obtención de perfiles (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

- 5 También se incluyó en el gel una escala estándar de referencia de dextrano (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA, EE. UU.), junto con los oligosacáridos de referencia GlcNAc<sub>2</sub>(+Fuc)Man<sub>3</sub> y GlcNAc<sub>2</sub>(-Fuc)Man<sub>3</sub> (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA, EE. UU.). Después, las bandas en el gel se cuantificaron por barrido del gel para detección de fluorescencia con un sistema de obtención de imágenes SE2000 con software de obtención de imágenes (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA, EE. UU.).

10

**[0099]** La relación (%) entre la intensidad de la fluorescencia de las bandas que representan las dos estructuras centrales GlcNAc<sub>2</sub>(Fuc)Man<sub>3</sub> y GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> (estructuras centrales) y la intensidad total de las bandas con movilidad ≤ GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> en un carril dado proporcionó el porcentaje de GCR modificada. Dado que la GCR actúa como sustrato para las tres enzimas diana, sialidasa, β-galactosidasa y β-hexosaminidasa, los resultados de FACE se correlacionan con la actividad de las enzimas diana frente a la GCR. Los valores de FACE para la GCR pueden variar de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 90 % y de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 85 %.

#### Medida de la actividad de la enzima diana y determinación de las U/ml de la enzima diana

20

**[0100]** La actividad enzimática de una enzima diana puede evaluarse mediante un ensayo apropiado determinado por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Eienthal y col., *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, EE. UU., 2002 y las descripciones en los ejemplos).

- 25 **[0101]** La actividad enzimática de las tres enzimas diana empleadas en los ejemplos presentados a continuación se describe en los seis párrafos siguientes.

#### Ensayo de la actividad de la β-glucocebrosidasa (GCR):

- 30 **[0102]** La actividad de disoluciones madre de β-glucocebrosidasa (β-D-glucosidasa) se determinó mediante la medida de la tasa de hidrólisis del sustrato sintético *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (pNP-βGlc) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) a *p*-nitrofenol (pNP). En estos ensayos, se añadieron 80 µl de pNP-βGlc 10 mM a 20 µl de una muestra de β-glucocebrosidasa y la muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Después de detener la reacción con 800 µl de glicina 0,1 M, pH 10,5, se midió la absorbancia de la muestra a 400 nm. La actividad de la muestra de β-glucocebrosidasa se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{400}) \times (\text{factor de dilución de la muestra}) \times (\text{volumen total de la muestra de ensayo})}{\epsilon \times (\text{tiempo}) \times (\text{recorrido de la luz}) \times (\text{volumen de la muestra})}$$

- en que  $A_{400}$  es la absorbancia de la muestra a 400 nm,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de pNP a 400 nm, el tiempo se mide en minutos, el recorrido de la luz es de 1 cm y el volumen de la muestra se mide en ml.

40

#### Ensayo de la actividad de la α-glucocebrosidasa:

- [0103]** La actividad de disoluciones madre de α-glucocebrosidasa (α-D-glucocebrosidasa) se determinó mediante la medida de la tasa de hidrólisis del sustrato sintético *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (pNP-αGlc) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) a *p*-nitrofenol (pNP). En estos ensayos, se añadieron 225 µl de pNP-αGlc 40 mM a 25 µl de una muestra de α-glucocebrosidasa y la muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Después de detener la reacción con 0,25 ml de glicina 0,3 M, pH 10,6, se midió la absorbancia de la muestra a 400 nm. La actividad de la muestra de α-glucocebrosidasa se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

50

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{400}) \times (\text{factor de dilución de la muestra}) \times (\text{volumen total de la muestra de ensayo})}{\epsilon \times (\text{tiempo}) \times (\text{recorrido de la luz}) \times (\text{volumen de la muestra})}$$

- en que  $A_{400}$  es la absorbancia de la muestra a 400 nm,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de pNP a 400 nm, el tiempo se mide en minutos, el recorrido de la luz es de 1 cm y el volumen de la muestra se mide en ml.

55

#### Ensayo de la actividad de la α-galactosidasa:

**[0104]** La actividad de disoluciones madre de α-galactosidasa (α-D-galactosidasa) se determinó mediante la

medida de la tasa de hidrólisis del sustrato sintético *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (pNP- $\alpha$ Gal) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) a *p*-nitrofenol (pNP). En estos ensayos, se añadieron 75  $\mu$ l de pNP- $\alpha$ Gal 30 mM a 175  $\mu$ l de una muestra de  $\alpha$ -galactosidasa y la muestra se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Después de detener la reacción con 0,25 ml de borato de sodio 0,5 M, pH 9,0, se midió la absorbancia de la muestra a 405 nm. La actividad de la muestra de  $\alpha$ -galactosidasa se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(\Delta\text{DO muestra}) \times (\text{factor de dilución}) \times (\text{concentración estándar pNP}) \times (\text{volumen total de ensayo})}{(\text{tiempo}) \times (\Delta\text{DO estándar}) \times (\text{volumen de la muestra})}$$

en que  $\Delta$ DO es la diferencia entre la absorbancia a 405 nm de la muestra (o estándar) y el blanco, el tiempo se mide en minutos y el volumen de la muestra se mide en ml.

Ensayo de la actividad de la sialidasa (neuraminidasa):

**[0105]** La actividad de disoluciones madre de sialidasa (neuraminidasa) se determinó mediante la medida de la tasa de la hidrólisis catalizada por sialidasa del sustrato sintético ácido 4-metilumbeliferil-*N*-acetilneuramínico (4MU-NANA) (Sigma Aldrich Company, San Luis, MO, EE. UU.) a 4-metilumbeliferona (4MU). En estos ensayos, se añadieron 100  $\mu$ l de 4MU-NANA 5-10  $\mu$ M a 10  $\mu$ l de sialidasa purificada. Después de 15 minutos, la reacción se detuvo por adición de 5 ml de glicina 0,1 M, pH 10,5 y 1,5 ml de la muestra se analizaron con un fluorómetro (excitación 360 nm, emisión 450 nm). Los resultados se extrapolaron sobre una curva estándar generada con una disolución de 4MU para determinar la cantidad de 4MU producida durante la incubación. La actividad se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(4\text{MU producida}) \times (\text{factor de dilución de la muestra})}{(\text{volumen de la muestra}) \times (\text{tiempo}) \times 1.000}$$

en que la cantidad de 4MU producida se mide en nmol, el volumen de la muestra se mide en ml y el tiempo se mide en minutos. Así, por ejemplo, mediante el uso del cálculo anterior, si se determina que una disolución madre de una enzima tiene una actividad de 1.000 unidades/ml y se desea usar 2.000 unidades de la enzima en una reacción enzimática, la reacción requerirá 2 ml de dicha disolución madre.

Ensayo de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa:

**[0106]** La actividad de disoluciones madre de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-galactosidasa) se determinó mediante la medida de la tasa de hidrólisis del sustrato sintético *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (oNPGal) (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) a *o*-nitrofenol (oNP). En estos ensayos, se añadieron 400  $\mu$ l de oNPGal 15 mM a 100  $\mu$ l de una muestra de  $\beta$ -galactosidasa y la muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Después, la reacción se detuvo con 2,5 ml de glicina 0,1 M, pH 10,5 y se midió la absorbancia de la muestra a 430 nm. La actividad de la muestra de  $\beta$ -galactosidasa se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{430}) \times (\text{factor de dilución de la muestra}) \times (\text{volumen total de la muestra de ensayo})}{\epsilon \times (\text{tiempo}) \times (\text{recorrido de la luz}) \times (\text{volumen de la muestra})}$$

en que  $A_{430}$  es la absorbancia de la muestra a 430 nm,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de oNP a 430 nm, el tiempo se mide en minutos, el recorrido de la luz es de 1 cm y el volumen de la muestra se mide en ml.

Ensayo de la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa:

**[0107]** La actividad de disoluciones madre de  $\beta$ -hexosaminidasa ( $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa) se determinó mediante la medida de la tasa de la hidrólisis catalizada por  $\beta$ -hexosaminidasa del sustrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-*N*-acetilglucosamínido (pNPGlcNAc) (Sigma Chemical, San Luis, MO, EE. UU.) a *p*-nitrofenol (pNP). En estos ensayos, se añadieron 400  $\mu$ l de pNPGlcNAc 4 mM a 100  $\mu$ l de una muestra de  $\beta$ -hexosaminidasa. La muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Después de detener la reacción con 2,5 ml de glicina 0,1 M, pH 10,5, se midió la absorbancia de la muestra a 400 nm. La actividad de la muestra de  $\beta$ -hexosaminidasa se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{400}) \times (\text{factor de dilución de la muestra}) \times (\text{volumen total de la muestra de ensayo})}{\epsilon \times (\text{tiempo}) \times (\text{recorrido de la luz}) \times (\text{volumen de la muestra})}$$

en que  $A_{400}$  es la absorbancia de la muestra a 400 nm,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de pNP a 400 nm, el tiempo se mide en minutos, el recorrido de la luz es de 1 cm y el volumen de la muestra se mide en ml.

**[0108]** Según se usa en este documento, “vs” significa el volumen del sistema usado (por ejemplo, en el caso de una columna, vs se refiere al volumen del lecho de resina más el volumen contenido en el entubado asociado a la columna; en el caso de una pila, el volumen del sistema se refiere al volumen total de la pila). “U/l vs” se refiere a las unidades de enzima por litro de volumen del sistema. “% p/l vs” se refiere al porcentaje en peso por litro de volumen del sistema.

#### 10 **Ejemplo 1: Efecto del HES en la estabilidad de la GCR**

**[0109]** Se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto del HES sobre la enzima diana  $\beta$ -glucocerebrosidasa en condiciones destinadas a estimular una pérdida de la actividad enzimática de la enzima diana en ausencia de un estabilizante como HES (es decir, enzima sometida a estrés). Específicamente, se preparó GCR a una concentración de 4 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5 para obtener disoluciones con el 0 %, el 10 % o el 40 % de HES mediante la adición de los volúmenes apropiados de una disolución madre de HES al 50 %. Las preparaciones se incubaron a 40 °C durante los tiempos indicados y después se tomaron muestras que se congelaron a -80 °C. Las muestras se descongelaron para el análisis de la actividad de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. La tabla 6 muestra la actividad enzimática en el tiempo. La figura 7 muestra la actividad en los puntos temporales como un porcentaje de la actividad inicial (T0; 0 h).

Tabla 6: Efecto del HES en la estimulación de la actividad de la GCR

Estudio de GCR y HES Tiempo (hora)	Actividad (U/ml)		
	0 % de HES	10 % de HES	40 % de HES
0	120,83 $\pm$ 3,76	118,59 $\pm$ 7,12	70,23 $\pm$ 8,05
1	45,23 $\pm$ 0,62	62,37 $\pm$ 1,15	94,69 $\pm$ 2,36
2	17,00 $\pm$ 0,13	29,88 $\pm$ 1,34	82,27 $\pm$ 3,80
3	7,64 $\pm$ 0,55	13,76 $\pm$ 0,6	69,15 $\pm$ 7,96
4	1,73 $\pm$ 0,02	6,07 $\pm$ 0,15	59,32 $\pm$ 2,39
6	0,57 $\pm$ 0,03	2,16 $\pm$ 0,08	51,30 $\pm$ 3,45
22	0,14 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02	23,07 $\pm$ 0,01
48	0,09 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,00	20,72

Medias y desviaciones estándar de los ensayos de actividad realizados en muestras duplicadas.

**[0110]** Los datos en la tabla 6 indican que la enzima diana GCR con el 0 % y el 10 % de HES perdió más del 95 % de su actividad en condiciones de estrés durante 6 horas a 40 °C. En contraste, la muestra que contenía el 40 % de HES mantuvo más del 50 % de la actividad inicial en el mismo periodo de tiempo en las mismas condiciones de estrés. Estos datos demuestran que la enzima diana GCR se estabiliza por la presencia del polisacárido HES.

#### 30 **Ejemplo 2: Efecto del HES en la estabilidad de la $\alpha$ -glucosidasa**

**[0111]** Se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto de HES sobre la enzima diana  $\alpha$ -glucosidasa. Se preparó  $\alpha$ -glucosidasa purificada en condiciones destinadas a estimular una pérdida de la actividad enzimática de la enzima diana en ausencia de un estabilizante como HES. Específicamente, la enzima se preparó en acetato de sodio 50 mM, pH 4,0 y después se prepararon disoluciones que contenían el 0 %, el 10 % o el 40 % de HES y  $\alpha$ -glucosidasa mediante la adición de los volúmenes apropiados de una disolución madre de HES al 50 %. Las disoluciones se incubaron a 40 °C y se tomaron muestras en los puntos temporales indicados que se congelaron a -80 °C. A continuación, las muestras se descongelaron y se analizaron en cuanto a la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa. La tabla 7 muestra la actividad medida en las diversas muestras en un espacio de tiempo de 0 a 20 días. La figura 8 muestra la actividad en los puntos temporales como un porcentaje de la actividad inicial (T0; tiempo cero).

Tabla 7: Efecto del HES en la estimulación de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa

Estudio de $\alpha$ Glu y HES Tiempo (día)	Actividad (U/ml)		
	0 % de HES	10 % de HES	40 % de HES
0	5,91 $\pm$ 0,46	18,36 $\pm$ 0,27	14,72 $\pm$ 0,71
1	4,78 $\pm$ 0,06	15,49 $\pm$ 0,18	15,58 $\pm$ 0,12
4	0,79 $\pm$ 0,01	10,0 $\pm$ 0,01	13,95 $\pm$ 0,01

6	0,57 ± 0,00	6,93 ± 0,17	13,54 ± 0,22
8	0,43 ± 0,01	5,71 ± 0,29	13,37 ± 0,54
11	0,06 ± 0,02	4,69 ± 0,12	14,89 ± 0,49
20	sd	1,92 ± 0,02	18,85 ± 0,26
sd – sin datos			
medias y desviaciones estándar de los ensayos de actividad realizados en muestras duplicadas.			

**[0112]** La actividad esperada para una disolución inicial de la enzima diana  $\alpha$ -glucosidasa, antes de su preparación en el tampón de pH 4,0, fue de aproximadamente 16 U/ml. En el proceso de preparación de las muestras a pH 4,0 (30 min a 1 h), la muestra de control, con el 0 % de HES, mostró una disminución de aproximadamente el 63 % con respecto a su actividad de  $\alpha$ -glucosidasa inicial. Las muestras con el 10 % y el 40 % de HES no experimentaron esta pérdida de actividad. En la muestra con el 0 % de HES sólo se demostró aproximadamente el 10 % de la actividad restante en el día 4. La muestra con el 10 % de HES mantuvo aproximadamente el 55 % de su actividad durante el mismo periodo de tiempo y la muestra con el 40 % de HES mantuvo esencialmente la actividad completa durante todo el estudio (20 días). Estos datos demuestran que la  $\alpha$ -glucosidasa se estabiliza por la presencia de HES.

### **Ejemplo 3: Efecto del HES en la estimulación de la estabilidad de la $\alpha$ -galactosidasa**

**[0113]** La enzima diana,  $\alpha$ -galactosidasa, se preparó a la misma concentración de proteína en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, con el 0 %, el 10 % o el 40 % de HES. Las preparaciones se incubaron a 40 °C durante los tiempos indicados y entonces se tomaron las muestras que se congelaron a -80 °C. Las muestras se descongelaron y se analizaron en cuanto a la actividad de la  $\alpha$ -galactosidasa. La tabla 8 muestra la actividad enzimática en el tiempo. La muestra de control, con el 0 % de HES no mostró esencialmente ninguna actividad en el día 3, mientras que la muestra con el 40 % de HES mostró aproximadamente el 35 % de su actividad inicial en el día 3 y aproximadamente el 13 % en el día 12. Estos datos demuestran que la  $\alpha$ -galactosidasa se estabiliza por la presencia de HES.

Tabla 8: Efecto de HES en la estimulación de la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa

Estudio de $\alpha$ Gal y HES	Actividad (U/ml)		
	0 % de HES	10 % de HES	40 % de HES
Tiempo (día)			
0	307,2	310,7	374,2
4	0,3	0,7	130,6
6	0	0	90,9
10	0	0	54,7
12	0	0	46,9

### **Ejemplo 4: Compuestos analizados en cuanto a su capacidad de estimulación de la actividad enzimática**

**[0114]** Se evaluaron cinco compuestos en cuanto a su capacidad de estimulación de la actividad enzimática de tres enzimas diana (sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa): (1) glicerol, (2) propilenglicol, (3) un hidrolizado de proteínas de soja, HY-SOY™ (Quest International, Chicago, IL, EE. UU.), (4) hidroxietilalmidón ("HES"), (B. Braun, Puerto Rico, a no ser que se indique lo contrario) y (5) Hmxl.

**[0115]** El HES se preparó como una disolución madre al 20 % (p/v) mediante la disolución de HES sólido en un tampón del pH adecuado. Para este ejemplo se usó un tampón de citrato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 5,7. La disolución madre al 20 % (p/p) se usó para alcanzar una concentración final del 5 % p/l vs de HES en los cócteles de las enzimas diana. Las disoluciones madre de Haemaccel (Hmxl) (Aventis-Behring GmbH, Marburgo, Alemania), a una concentración de partida del 3,5 %, se usaron en las cantidades indicadas en los ejemplos a continuación. El glicerol y el propilenglicol se añadieron al 10 % (p/v) y HY-SOY™, un polvo seco, al 5 % (p/v) a un tampón de citrato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 5,7.

**[0116]** Se prepararon cócteles de enzimas diana que contenían las tres enzimas diana por combinación de sialidasa (210 U/l vs),  $\beta$ -galactosidasa (33 U/l vs),  $\beta$ -hexosaminidasa (2.500 U/l vs) y Hmxl (14 ml/l vs) o HES (5 % p/l vs). Cada cóctel de enzimas diana se procesó después separadamente de la manera siguiente: el cóctel se cargó en una columna de fenil-Sepharose™ (a temperatura ambiente), equilibrada previamente con un tampón de citrato de sodio 100 mM con cloruro de calcio 5 mM a pH 5,7 y cargada posteriormente con el sustrato GCR en una cantidad de 70 a 120 U de GCR por ml de resina en la columna. La actividad enzimática de la GCR se mide mediante ensayos estándar (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. 6.451.600). El sustrato se unió a la columna. El

cóctel de enzimas diana se recicló entonces a través de la columna a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Después, el cóctel de enzimas diana se lavó de la columna y el sustrato se eluyó con propilenglicol y se recogió. Los resultados se muestran en la tabla 9.

5

Tabla 9: Resultados de los compuestos analizados

Aditivo	% de modificación (ensayo FACE)
Sin aditivo	53,1
0,05 % de Hmxl	69,1
10 % de glicerol	34,2
10 % de propilenglicol	51,1
5 % de HES	68,6
5 % de HY-SOY™	57,2

[0117] El grado de modificación de oligosacáridos/polisacáridos aumentó sustancialmente en presencia de Hmxl o de hidroxietilalmidón (HES), según la medida por electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos (FACE) (69,1 y 68,6, respectivamente; tabla 9), en comparación con la ausencia de aditivos (53,1; tabla 9). Por consiguiente, tanto Hmxl como HES fueron capaces de estimular la actividad enzimática de las enzimas diana usadas en esta reacción. Los otros tres compuestos analizados no mostraron estimulación de las enzimas diana (HY-SOY™ y propilenglicol) o mostraron una disminución de la actividad de las enzimas diana (glicerol).

#### 15 **Ejemplo 5: La estimulación de la actividad de las enzimas diana por Hmxl y HES**

[0118] La misma cantidad de las tres enzimas diana se usó en cada uno de los seis experimentos que se muestran a continuación en la tabla 10.

20 [0119] Una mezcla de sialidasa (210 U/l vs),  $\beta$ -galactosidasa (33 U/l vs) y  $\beta$ -hexosaminidasa (2.500 U/l vs) se examinó sin ningún polisacárido no natural o en presencia de Hmxl (14 ml/l vs) o HES (5 % p/l vs) a temperatura ambiente. El cóctel de enzimas diana se cargó en una columna de fenil-Sepharose™ equilibrada previamente con un tampón de citrato de sodio 100 mM con cloruro de calcio 5 mM a pH 5,7 y cargada posteriormente con el sustrato en una cantidad de 70 a 120 U de GCR por ml de resina en la columna. El sustrato se unió a la columna. El cóctel de enzimas diana se recicló entonces a través de la columna durante aproximadamente 24 horas. Después de aproximadamente 24 horas, el cóctel de enzimas diana se lavó de la columna y el sustrato se eluyó, se recogió y se evaluó mediante el análisis FACE. Los resultados se muestran en la tabla 10.

30

Tabla 10: La estimulación de la actividad de las enzimas diana en presencia de Hmxl o HES

Experimento	Sialidasa U/l vs	$\beta$ -gal U/l vs	$\beta$ -hex U/l vs	pH	HES % p/l vs	Hmxl ml/l vs	FACE
1	210	33	2.500	5,7	0	0	54,4
2	210	33	2.500	5,7	0	14	70,4
3	210	33	2.500	5,7	0	14	75,1
4	210	33	2.500	5,7	5	0	84,5
5	210	33	2.500	5,7	5	0	80,6

[0120] Los datos de la tabla 10 demuestran que ambos, Hmxl y HES, pueden estimular la actividad enzimática de las enzimas diana, es decir, aumentar la capacidad de las enzimas diana para modificar oligosacáridos/polisacáridos. La modificación de oligosacáridos/polisacáridos se reduce sustancialmente en ausencia de ambos, Hmxl y HES (véase la tabla 10, experimento 1). Aunque tanto Hmxl como HES son estimulantes eficaces de la actividad de las enzimas diana, Hmxl es un péptido de origen animal, mientras que HES es un polisacárido derivado de fuentes no animales (por ejemplo, vegetales). Por lo tanto, los polisacáridos de esta descripción son especialmente útiles para estimular la actividad de una enzima diana en situaciones en las que los componentes animales no son deseables, como en la producción o preparación de productos terapéuticos, alimentos o artículos de consumo para humanos o animales.

#### **Ejemplo 6: La estimulación de la actividad de las enzimas diana por HES reduce la cantidad necesaria de enzimas diana para conseguir una modificación comparable del sustrato**

45 [0121] En este ejemplo, el cóctel de enzimas diana usado para la modificación de oligosacáridos/polisacáridos contenía el 5 % p/l vs de HES o no contenía HES.



**[0122]** Para los cócteles de enzimas diana que contenían HES se añadieron sialidasa (105 U/l vs),  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal, 16,5 U/l vs) y  $\beta$ -hexosaminidasa ( $\beta$ -hex, 1.250 U/l vs) en citrato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 5,5 a HES (cantidad final de HES del 5 % p/l vs).

5

**[0123]** Para los cócteles de enzimas diana preparados en ausencia de un polisacárido de origen no natural se combinaron sialidasa (168 U/l vs),  $\beta$ -galactosidasa (52,8 U/l vs) y  $\beta$ -hexosaminidasa (3.000 U/l vs) en citrato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 5,5.

10 **[0124]** Todos los cócteles se mantuvieron a 2 – 10 °C hasta su uso. Cada cóctel de enzimas diana se procesó entonces separadamente de la manera siguiente:

**[0125]** El cóctel de enzimas diana se añadió a una columna de fenil-Sepharose™ que había sido equilibrada con un tampón de citrato de sodio 100 mM con cloruro de calcio 5 mM a pH 5,5 y después cargada con el sustrato (70 a 120 U de GCR/ml de resina), a temperatura ambiente. El cóctel de enzimas diana se recicló a través de la columna durante aproximadamente 24 horas. A continuación, la columna se lavó con un volumen de columna de equilibrado y después con cinco volúmenes de columna de un tampón que contenía propilenglicol al 20 % para eliminar el cóctel de enzimas diana. El sustrato se eluyó de la columna con propilenglicol. Los componentes oligosacáridos resultantes de cada una de las siete reacciones de prueba se evaluaron mediante el ensayo FACE y se muestran en la tabla 11.

20

Tabla 11: Estimulación de la actividad de las enzimas diana sobre un sustrato de GCR en presencia de HES a pH 5,5

Experimento	Sialidasa U/vs	$\beta$ -gal Uvs	$\beta$ -hex U/vs	HES (%/vs)	FACE
1	168	52,8	3.000	0	69,4
2	168	52,8	3.000	0	69,9
3	168	52,8	3.000	0	70,0
4	168	52,8	3.000	0	71,8
5	105	16,5	1.250	5	72
6	105	16,5	1.250	5	72,7
7	105	16,5	1.250	5	72,7

25

**[0126]** Los tres experimentos en presencia del 5 % de HES (experimentos 5 – 7) requirieron sustancialmente menores cantidades de las tres enzimas diana para conseguir la modificación de los oligosacáridos/polisacáridos, en comparación con los experimentos realizados en ausencia de HES (experimentos 1 – 4). El valor medio de FACE para las cuatro reacciones de prueba en ausencia de HES fue de 70,3 +/- 1,1, mientras que el valor medio de FACE para los experimentos en presencia de HES fue de 72,5 +/- 0,4. Es de importancia que los cócteles de enzimas diana sin aditivos contenían 1,6x (en que "x" indica múltiplo) la cantidad de sialidasa, 3,2x la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa y 2,4x la cantidad de  $\beta$ -hexosaminidasa en comparación con los cócteles de las enzimas diana con HES. por lo tanto, en ausencia de HES, el proceso requiere un aumento considerable de las cantidades de las enzimas diana.

35

**[0127]** En otro estudio (véase la tabla 12), el cóctel de enzimas diana se usó con una reacción de modificación de oligosacáridos/polisacáridos que contenía el 5 % p/l vs de HES o no contenía HES.

**[0128]** Una disolución madre de HES al 20 % (p/p), producida por la disolución de HES sólido en citrato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 5,5, se usó para alcanzar una concentración final del 5 % p/l vs de HES en un cóctel que contenía las unidades de enzima mostradas en la tabla 12 en citrato de sodio 100 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 5,5.

40

**[0129]** Los cócteles de las enzimas diana preparados en ausencia de un polisacárido de origen no natural se prepararon para contener las unidades de enzima (U/l vs) mostradas en la tabla 12.

45

**[0130]** Los cócteles se mantuvieron a 2 – 10 °C hasta su uso. Cada cóctel de enzimas diana se procesó entonces separadamente de la manera siguiente:

50 **[0131]** El cóctel de enzimas diana se añadió a una columna de fenil-Sepharose™ que había sido equilibrada con un tampón de citrato de sodio 100 mM con cloruro de calcio 5 mM a pH 5,5 y después cargada con el sustrato (70 a 120 U de GCR/ml de resina), a temperatura ambiente. El cóctel de enzimas diana se recicló a través de la

columna durante aproximadamente 24 horas. Después de la modificación de oligosacáridos, la columna se lavó para eliminar el cóctel de enzimas diana. El sustrato se eluyó de la columna con propilenglicol. El componente oligosacárido resultante de cada una de las cinco reacciones de prueba se evaluó mediante el ensayo FACE. Los resultados se muestran en la tabla 12.

5

Tabla 12: Menores cantidades requeridas de las enzimas diana en reacciones que contienen HES

Experimento	Sialidasa U/vs	$\beta$ -gal Uvs	$\beta$ -hex U/vs	HES ( %/vs)	FACE
1	168	52,8	3.000	0	69,4
2	105	16,5	1.250	5	72,0
3	168	52,8	3.750	0	77,1
4	84	19,8	1.500	5	76,9
5	210	33	2.500	5	85,0

[0132] Los datos de la tabla 12 demuestran que se obtuvieron valores de FACE comparables (o superiores) con menores cantidades de las enzimas diana en las reacciones que contenían HES. Por ejemplo, compárese el experimento 1 con el experimento 2; compárese también, por ejemplo, el experimento 3 con el experimento 4. Además, para alcanzar el valor más alto de FACE de 85 en presencia de HES (experimento 5), que es un valor de FACE superior en un 7,9 % al del experimento 3 (realizado en ausencia de un estimulante de las enzimas diana), se necesitó el 38 % menos de  $\beta$ -galactosidasa, el 33 % menos de  $\beta$ -hexosaminidasa y solo un incremento moderado de sialidasa del 25 % en el experimento 5 que contenía HES.

#### **Ejemplo 7: HES es compatible con diversas concentraciones de enzimas diana**

[0133] Las condiciones empleadas en este ejemplo son según se describen en el ejemplo 6, excepto porque todos los experimentos incluyeron el 5 % p/l vs de HES.

Tabla 13: El aumento de la cantidad de enzimas diana aumenta la modificación de oligosacáridos/polisacáridos del sustrato (GCR)

Experimento	Sialidasa U/vs	$\beta$ -gal Uvs	$\beta$ -hex U/vs	FACE
1	84	13,2	1.000	67,4
2	84	13,2	1.500	72,8
3	105	16,5	1.500	74,1
4	84	19,8	1.500	76,9
5	210	33	2.500	85,0

25

[0134] Los datos de la tabla 13 demuestran que el aumento de la cantidad de las enzimas diana en presencia de HES aumenta la modificación de oligosacáridos/polisacáridos. El valor de FACE aumentó en el 17,6 %, de 67,4 (experimento 1) a 85,0 (experimento 5), por un aumento de 2,5x de sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa. por lo tanto, HES es compatible con diversas concentraciones de enzimas.

30

#### **Ejemplo 8: El efecto del pH en la estimulación de las enzimas diana**

[0135] Las condiciones empleadas en este ejemplo fueron según se describen en el ejemplo 7, excepto porque el pH (del cóctel de enzimas diana, el tampón de equilibrado y los lavados de la columna) fue el pH indicado en la tabla 14 y la presencia de HES fue según se indica en la tabla 14.

35

Tabla 14: Efecto del pH en la estimulación de las enzimas diana

Experimento	Sialidasa U/vs	$\beta$ -gal Uvs	$\beta$ -hex U/vs	pH	HES ( %/vs)	FACE
1	126	19,8	1.500	5,5	5	75,3
2	210	39,6	1.500	5,7	5	75,8
3	210	66	3.750	5,7	0	76,0
4	252	79,2	4.500	5,9	0	72,2

[0136] El pH de una reacción de modificación enzimática puede tener un efecto en el perfil de oligosacáridos de un sustrato. En ausencia de HES, incluso al usar cantidades aumentadas de las enzimas diana, no se obtuvo un valor comparable de FACE al aumentar el pH de 5,7 a 5,9 (véanse los experimentos 3 y 4; tabla 14). En presencia

de HES, al aumentar el pH de 5,5 a 5,7 solamente se requirieron incrementos moderados de las cantidades de las enzimas diana para alcanzar valores comparables de FACE a los dos pH (compárese el experimento 2 con el experimento 1). Adicionalmente, la inclusión de HES en el cóctel de las enzimas diana redujo la cantidad necesaria de las enzimas diana para alcanzar un valor de FACE comparable a un pH dado (por ejemplo, compárese el experimento 2 con el experimento 3). Esto indica que un polisacárido de origen no natural como HES permite usar una menor cantidad de las enzimas diana dentro de un intervalo de pH y, por lo tanto, amplía el intervalo de pH en el que puede usarse una enzima diana para obtener su actividad deseada.

#### **Ejemplo 9: Aumento de la concentración de HES mejora la estimulación de las enzimas diana**

**[0137]** Las condiciones empleadas en este ejemplo fueron según se describen en el ejemplo 8, excepto porque el pH del cóctel de enzimas diana, el tampón de equilibrado y los lavados de la columna fue de 5,5, el cóctel de enzimas diana contenía el 2 % o el 5 % p/l vs de HES y las cantidades de las enzimas diana fueron idénticas entre sí en los dos experimentos.

Tabla 15: Efectos de las concentraciones de HES

Experimento	Sialidasa U/vs	$\beta$ -gal Uvs	$\beta$ -hex U/vs	HES (%/vs)	FACE
1	210	33	2.500	2	77,3
2	210	33	2.500	5	85,0

**[0138]** Los datos de la tabla 15 indican que el aumento de la concentración de HES del 2 % al 5 % mejora la estimulación de las enzimas diana. En este ejemplo, los valores de FACE aumentaron en el 7,7 % al aumentar HES del 2 % al 5 %.

**[0139]** Además, los datos indican que HES estimula la actividad de las enzimas diana a una concentración del 2 %. En ausencia de HES, a pH 5,5, se necesitaron unas cantidades de enzimas diana de 79,2 U/l vs de  $\beta$ -galactosidasa (2,4x la cantidad en el experimento 1 de la tabla 15) y 3.000 U/l vs de  $\beta$ -hexosaminidasa (1,2x la cantidad en el experimento 1 de la tabla 15) para un valor comparable de FACE (76,9 frente a 77,3 en el experimento 1; al usar las mismas condiciones empleadas en la tabla 15, excepto por la concentración de las enzimas diana).

#### **Ejemplo 10: HES de diferentes fuentes comerciales disponibles y diferentes PMP y SM estimula la actividad de las enzimas diana**

**[0140]** Se comparó el HES de dos fuentes comerciales disponibles adicionales, Ajinomoto (Raleigh, Carolina del Norte, EE. UU.) y Fresenius Kabi (Linz, Austria), con el HES de B. Braun con respecto a la estimulación de la actividad de las enzimas diana en una reacción de modificación de oligosacáridos/polisacáridos.

**[0141]** Las condiciones empleadas en este ejemplo fueron según se describen en el ejemplo 10, excepto porque el pH del cóctel de enzimas diana, el tampón de equilibrado y los lavados de la columna fue de 5,7 y el cóctel de enzimas diana contenía el 5 % p/l vs de HES de B. Braun, Ajinomoto o Fresenius Kabi. Las cantidades de las enzimas diana fueron idénticas para cada experimento de la tabla 16 (210 U/l vs de sialidasa, 39,6 U/l vs de  $\beta$ -galactosidasa y 1.500 U/l vs de  $\beta$ -hexosaminidasa).

**[0142]** Se compararon tres lotes diferentes de HES de Ajinomoto y tres lotes diferentes de HES de Fresenius Kabi con el HES de B. Braun. El HES de Ajinomoto está disponible comercialmente con un peso molecular promedio (PMP) en el intervalo de 550 – 760 kDa y una sustitución molar (SM) de 0,70 – 0,80. El HES de Fresenius Kabi está disponible comercialmente con un peso molecular promedio en el intervalo de 400 – 500 kDa y una sustitución molar de 0,65 – 0,75. El PMP y la SM indicados por el fabricante para los lotes de HES usados en este estudio se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Estimulación de la actividad de las enzimas diana con HES de tres proveedores diferentes

Fabricante	Lote	Réplicas (n)	PMP(kDa) / (SM) del fabricante	FACE
B. Braun	1	1	546 / (0,76)	73,7
Ajinomoto	1	3	654 / (0,8)	74,0 + / - 2,8
Ajinomoto	2	1	684 / (0,76)	70,1
Ajinomoto	3	1	701 / (0,76)	75,4

Media		5	na	73,5 +/- 2,8
Fresenius Kabi	1	2	448 / (0,72)	72,7 +/- 6,9
Fresenius Kabi	2	1	455 / (0,71)	77,3
Fresenius Kabi	3	1	424 / (0,69)	74,4
Media		4	na	74,3 +/- 4,5
na = no aplicable				

**[0143]** Los datos en la tabla 16 indican que se encontró una estimulación comparable de la actividad de las enzimas diana al usar el HES adquirido de B. Braun, Ajinomoto y Fresenius Kabi. Por lo tanto, se encontró que las ligeras variaciones en PMP y SM entre los lotes de HES del mismo proveedor y de diferentes proveedores no afectaron significativamente a la estimulación por HES de la actividad de las enzimas diana frente a su sustrato.

**Ejemplo 11: La estimulación por HES de la actividad de las enzimas diana es independiente del volumen del sistema (vs)**

10 **[0144]** Las condiciones empleadas en este ejemplo fueron según se describen en el ejemplo 10, excepto porque solamente se usó el HES de B. Braun para los experimentos. Las cantidades de las enzimas diana fueron idénticas para cada experimento de la tabla 17, es decir: 210 U/l vs de sialidasa, 39,6 U/l vs de  $\beta$ -galactosidasa y 1.500 U/l vs de  $\beta$ -hexosaminidasa. La "escala" indicada refleja una comparación entre el volumen de los sistemas usados en cada experimento mostrado en la tabla 17 (incluido el volumen ocupado por la resina fenólica y el entubado). Por ejemplo, un volumen del sistema de 1.500x significa que el volumen del sistema es 1.500 veces mayor que un volumen del sistema 1x (vs).

Tabla 17: Estimulación por HES de la actividad de las enzimas diana en diferentes volúmenes del sistema

Escala (vs)	Réplicas (n)	FACE
1x	3	77,7 +/- 2,7
1.500x	3	76,7 +/- 1,9

20 **[0145]** Los datos de la tabla 17 indican que la estimulación por HES de la actividad de las enzimas diana es independiente de la escala del volumen del sistema. En este ejemplo, la estimulación por HES de la actividad de las enzimas diana es eficaz y comparable en un amplio intervalo de volúmenes del sistema. Por lo tanto, la invención puede aplicarse a diversos procesos enzimáticos a escala industrial y comercial.

**Ejemplo 12: Efecto del HES en la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa en tampón**

30 **[0146]** Se lleva a cabo un estudio de predicción para evaluar el efecto del HES en la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa. La  $\alpha$ -galactosidasa a una concentración de aproximadamente 5,0 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, con el 0 %, el 10 % o el 40 % de hidroxietilalmidón se filtra asepticamente en un recipiente adecuado y se mantiene a 25 °C durante hasta 12 meses. Se toman muestras estériles a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses y se congelan a -80 °C. Las muestras se descongelan para su análisis y se evalúan mediante un ensayo de actividad de la  $\alpha$ -galactosidasa. La tabla 18 muestra la actividad en los puntos temporales como porcentaje de la actividad inicial (T0).

35 Tabla 18: Efecto del HES en la estimulación de la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa en tampón

Estudio de HES y $\alpha$ -galactosidasa	Actividad ( % de T0)				
	T0	3 meses	6 meses	8 meses	12 meses
Concentración de HES					
0 % (control)	100	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0
10 %	100	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control
40 %	100	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control

**[0147]** Las muestras de  $\alpha$ -galactosidasa con el 10 % y el 40 % de HES retienen como mínimo el 50 % o más de actividad con respecto a las muestras de  $\alpha$ -galactosidasa que no contienen HES. Por consiguiente, la  $\alpha$ -galactosidasa se estabiliza por la presencia de HES.

**5 Ejemplo 13: Efecto del HES en la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa en tampón y manitol**

**[0148]** Se lleva a cabo un estudio de predicción para evaluar el efecto del HES en la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa. La  $\alpha$ -galactosidasa a una concentración de 5,0 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, 3 % manitol (p/p), pH 7,0, con el 0 %, el 10 % o el 40 % de hidroxietilalmidón se filtra asépticamente en un recipiente adecuado y se mantiene a 25 °C durante hasta 12 meses. Se toman muestras estériles a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses y se congelan a -80 °C. Las muestras se descongelan para su análisis y se evalúan mediante un ensayo de actividad de la  $\alpha$ -galactosidasa. La tabla 19 muestra la actividad en los puntos temporales como porcentaje de la actividad inicial (T0).

Tabla 19: Datos de actividad del estudio de  $\alpha$ -galactosidasa y HES

Estudio de $\alpha$ -galactosidasa y HES	Actividad ( % de T0)				
	T0	3 meses	6 meses	8 meses	12 meses
Concentración de HES					
0 % (control)	100	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0
10 %	100	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control
40 %	100	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control

**[0149]** Las muestras de  $\alpha$ -galactosidasa con el 10 % y el 40 % de hidroxietilalmidón retienen como mínimo el 50 % o más de actividad con respecto a las muestras de  $\alpha$ -galactosidasa que no contienen HES. Por consiguiente, la  $\alpha$ -galactosidasa se estabiliza por la presencia de HES.

**20 Ejemplo 14: Efecto del HES en la estabilidad de  $\alpha$ -galactosidasa después de la reconstitución del producto liofilizado con agua que contiene HES**

**[0150]** Se lleva a cabo un estudio de predicción para evaluar la estabilidad de  $\alpha$ -galactosidasa liofilizada después de su reconstitución en agua con el 0 %, el 10 % o el 40 % de HES y la presencia o ausencia de un conservante adecuado como alcohol bencílico o fenol. La  $\alpha$ -galactosidasa a una concentración de 5,0 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM, 3 % manitol, pH 7,0 se liofiliza en los recipientes adecuados (viales). Los viales reconstituidos se mantienen a 25 °C y se toman muestras a los 0, 5, 10, 20 y 30 días que se analizan mediante un ensayo de pNP. La tabla 20 muestra la actividad en los puntos temporales como porcentaje de la actividad inicial (T0).

Tabla 20: Efecto del HES en la estabilidad de la  $\alpha$ -galactosidasa después de la reconstitución del producto liofilizado con agua que contiene HES

Estudio de $\alpha$ -galactosidasa y HES	Actividad ( % de T0)				
	T0	5 días	10 días	20 días	30 días
Concentración de HES					
0 % (control)	100	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0	menos del 50 % de la actividad de T0
10 %	100	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control	aumento del 50 % o más sobre el control
40 %	100	aumento del 50	aumento del 50	aumento del 50	aumento del 50

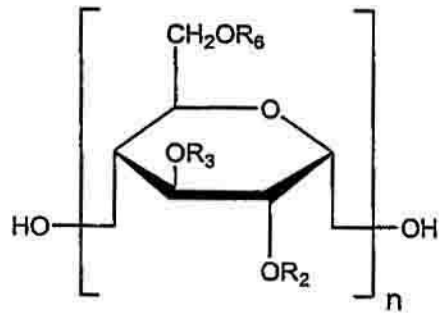
		% o más sobre el control	% o más sobre el control	% o más sobre el control	% o más sobre el control
Las muestras de $\alpha$ -galactosidasa con el 10 % y el 40 % de HES retienen como mínimo el 50 % o más de actividad con respecto a las muestras de $\alpha$ -galactosidasa que no contienen HES. Por consiguiente, la $\alpha$ -galactosidasa se estabiliza por la presencia de HES.					

**[0151]** Por consiguiente, los ejemplos en este documento demuestran un amplio intervalo de utilidad para las composiciones y procedimientos de la descripción, incluidos los procedimientos de la invención.

5 **[0152]** La mención de cualquier referencia en este documento no es una admisión de que tales referencias constituyen la técnica anterior a la presente invención. Todas las concentraciones de polisacáridos se expresan como volumen por peso, a no ser que se indique lo contrario.

## REIVINDICACIONES

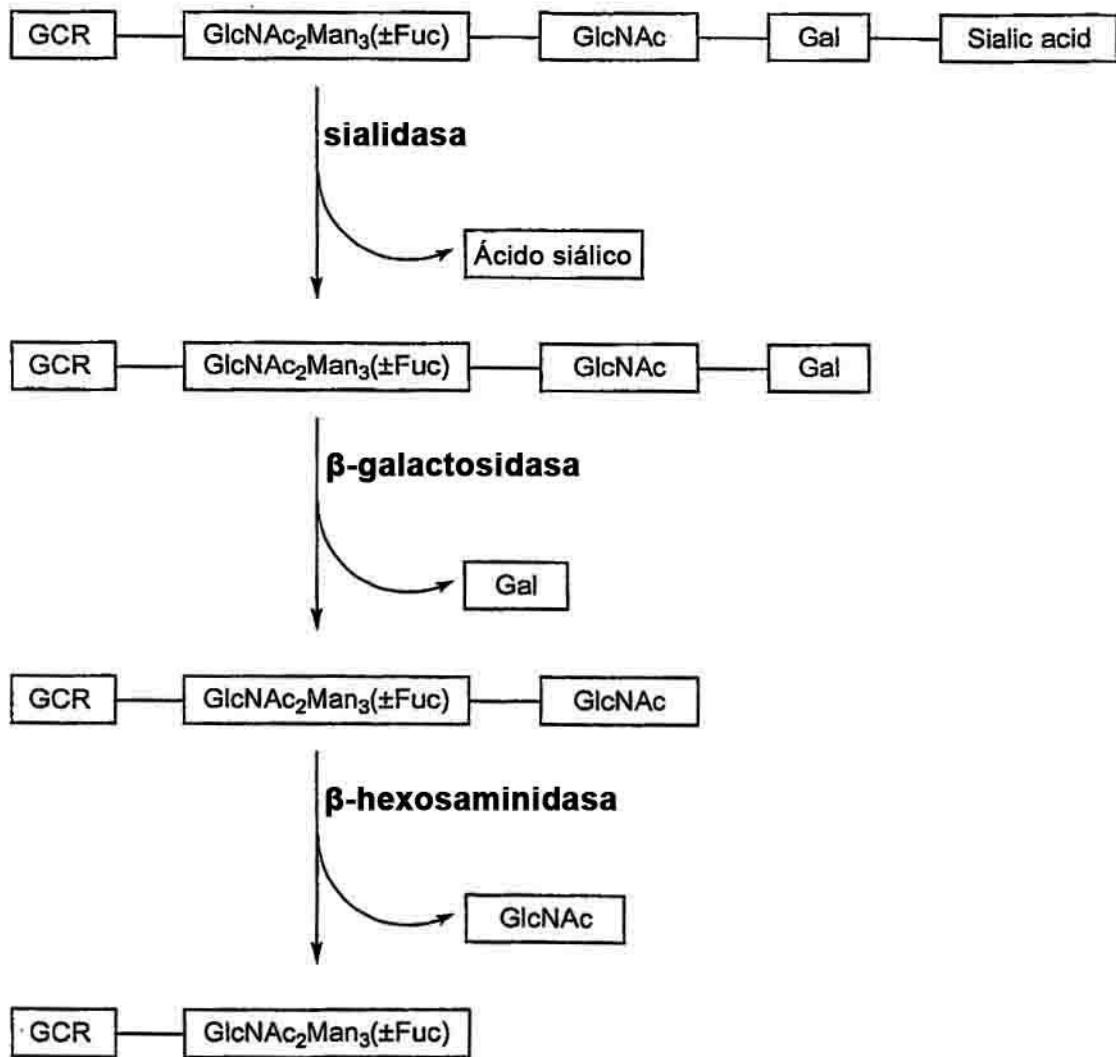
1. Un procedimiento para la estimulación de la actividad enzimática de una enzima diana, en que el procedimiento comprende:
- 5 (i) combinar una enzima diana, en que la enzima diana es:
- (a) una enzima de oligosacáridos/polisacáridos seleccionada del grupo que consta de: galactosiltransferasa, GalNAc-transferasa, oligosacariltransferasa, *N*-acetilglucosaminilfosfotransferasa, *O*-glucosiltransferasa, *N*-glucosiltransferasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\beta$ -galactosidasa, sialidasa (neuraminidasa),  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasa, *N*-acetilglucosamina-1-fosfodiéster- $\alpha$ -*N*-acetilglucosaminidasa, *N*-glucanasa (*N*-glucosidasa F), *O*-glucanasa (endo- $\alpha$ -*N*-acetilgalactosaminidasa), endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa H, sialato-*O*-acetiltransferasa, sialato-*O*-acetilesterasa y  $\alpha$ -glucosidasa o
- 10 (b) una hidrolasa lisosómica seleccionada del grupo que consta de:  $\alpha$ -galactosidasa A, ceramidasa ácida,  $\alpha$ -L-fucosidasa ácida,  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida (GCR),  $\beta$ -galactosidasa ácida, iduronato-2 sulfatasa,  $\alpha$ -L-iduronidasa, galactocerebrosidasa,  $\alpha$ -manosidasa ácida,  $\beta$ -manosidasa ácida, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, *N*-acetilgalactosamina-6-sulfatosulfatasa,  $\beta$ -galactosidasa ácida, esfingomielinasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida,  $\beta$ -hexosaminidasa B, heparán-*N*-sulfatasa,  $\alpha$ -*N*-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA:  $\alpha$ -glucosaminido-*N*-acetiltransferasa, *N*-acetilglucosaminina-6-sulfatosulfatasa,  $\alpha$ -*N*-acetilgalactosaminidasa, sialidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa A;
- 15 con de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 50 % p/v de un hidroxialquilalmidón y con un sustrato de la enzima diana, con lo que se produce una combinación; y
- 25 (ii) mantener la combinación en condiciones suficientes para estimular la actividad enzimática de la enzima diana, en que las condiciones son entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 40 °C.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el hidroxialquilalmidón se selecciona del grupo que consta de hidroximetilalmidón, hidroxietilalmidón (HES), hidroxipropilalmidón e hidroxibutilalmidón.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el hidroxialquilalmidón es hidroxietilalmidón (HES).
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el sustrato es una hidrolasa
- 35 lisosómica.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enzima diana se selecciona del grupo que consta de: sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasa y una combinación de estas; en que el polisacárido de origen no natural es HES; y en que el sustrato es  $\beta$ -glucocerebrosidasa.
- 40 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento comprende además permitir a la enzima diana modificar el sustrato para producir un sustrato modificado y recuperar el sustrato modificado.
- 45 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enzima diana es una combinación de sialidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexosaminidasa; y en que el almidón de origen no natural es HES, que está presente en una cantidad de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 12 % p/v.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las condiciones comprenden además un tampón de
- 50 citrato y cloruro de calcio a un pH de aproximadamente 6.



$R_2 = \text{H, CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   
 $R_3 = \text{H, CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   
 $R_6 = \text{H, CH}_2\text{CH}_2\text{OH, o enlace 1,6 con otras unidades de } \alpha\text{-D-glucopiranosilo}$

Fig. 1





**Fig. 2**

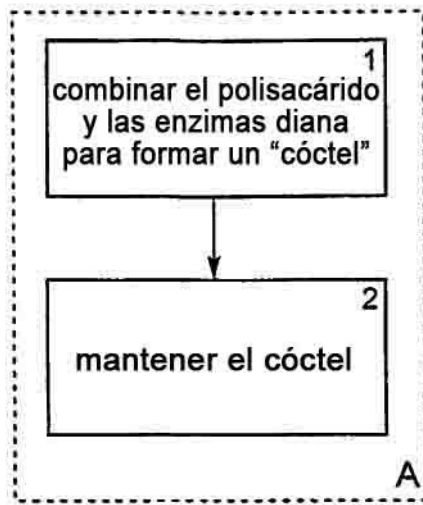


Fig. 3

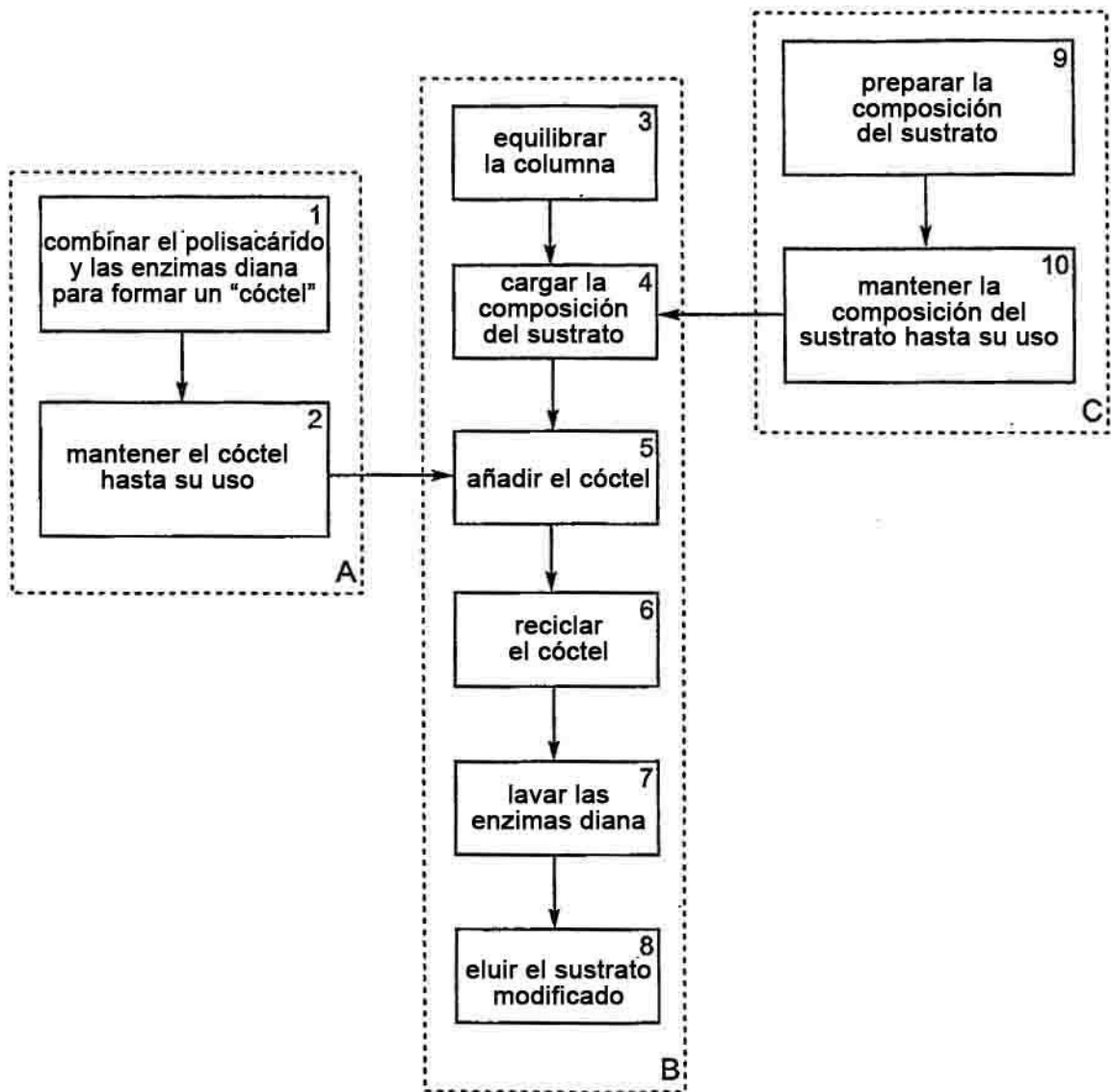


Fig. 4

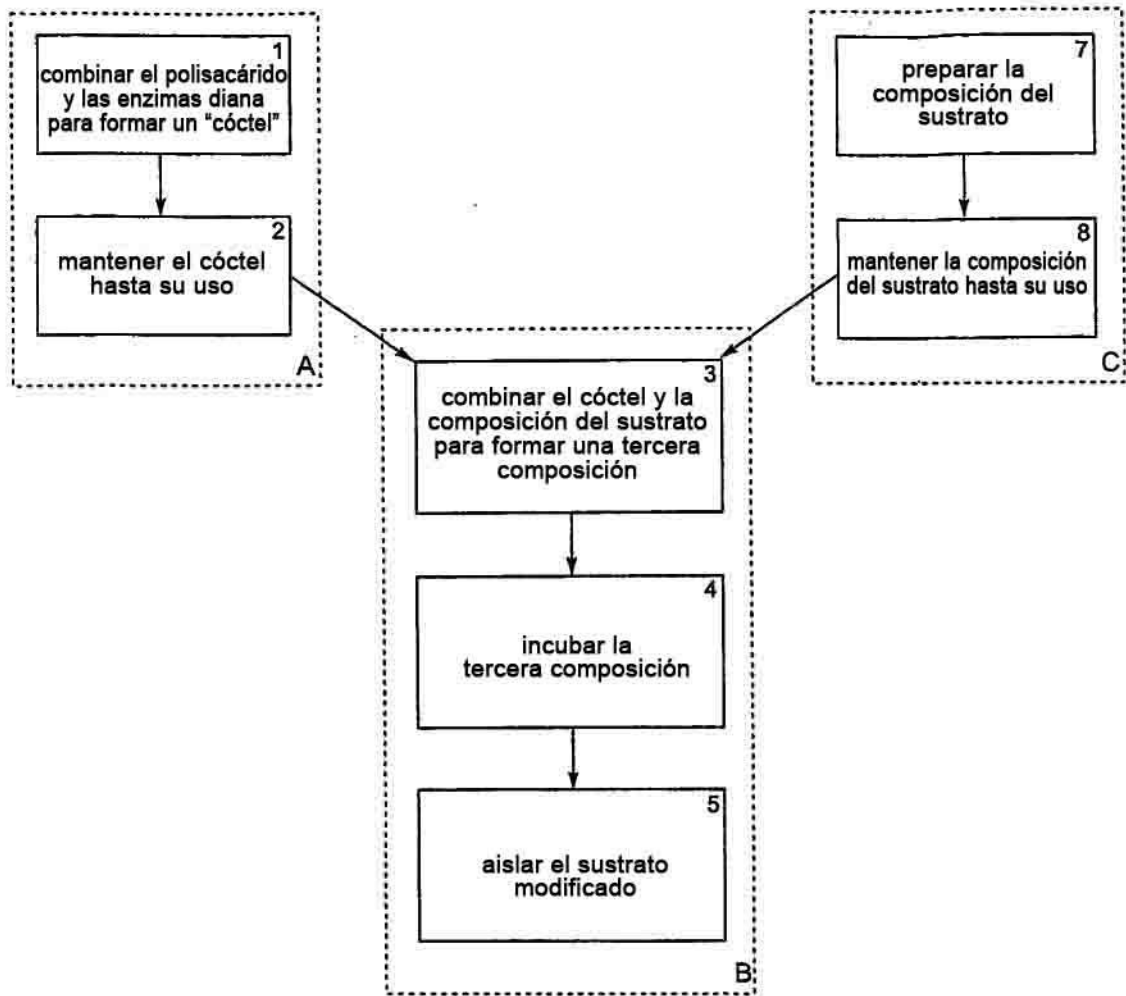


Fig. 5

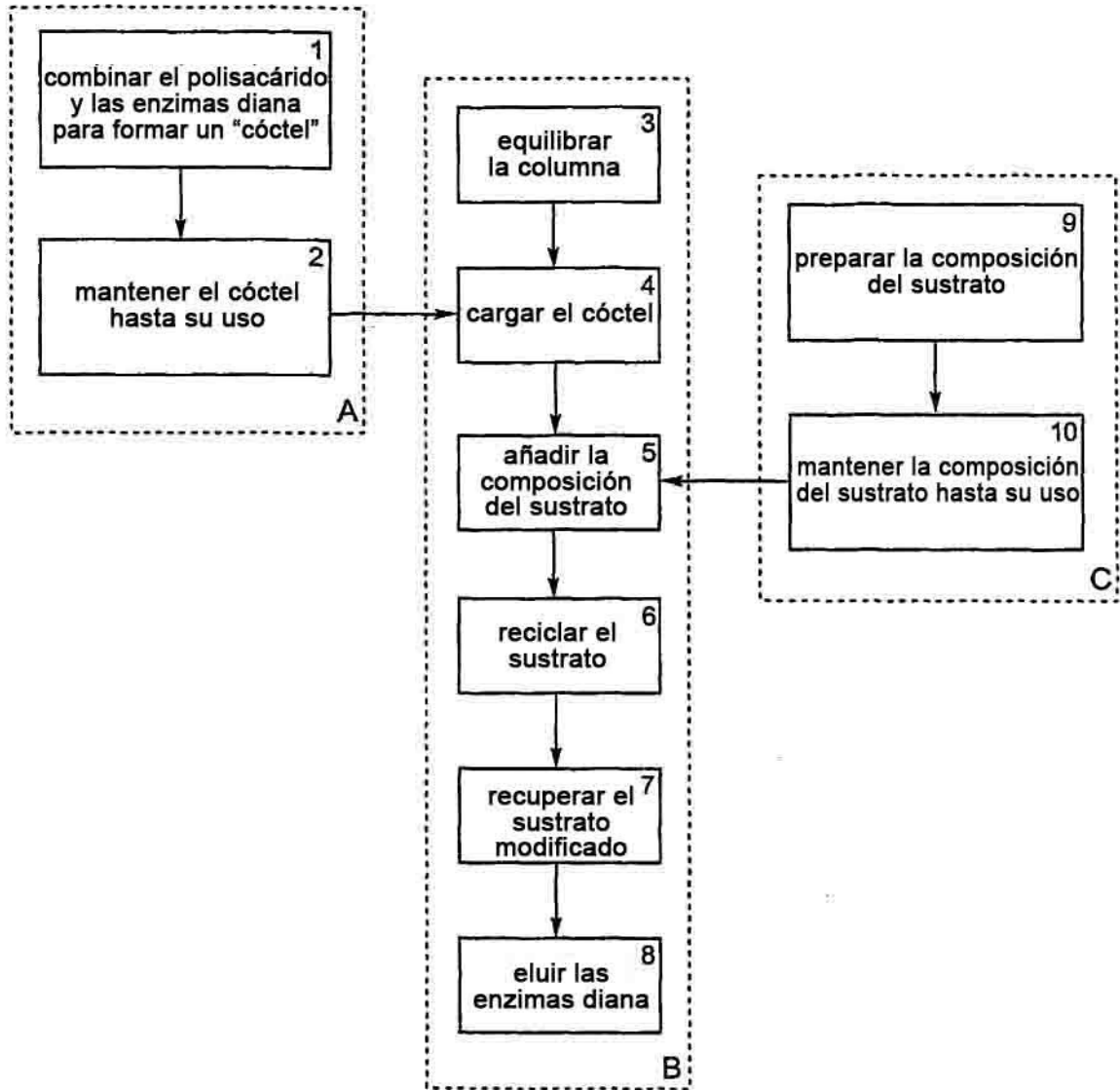


Fig. 6

**Efecto del HES en la estimulación de la actividad de la rGCR**

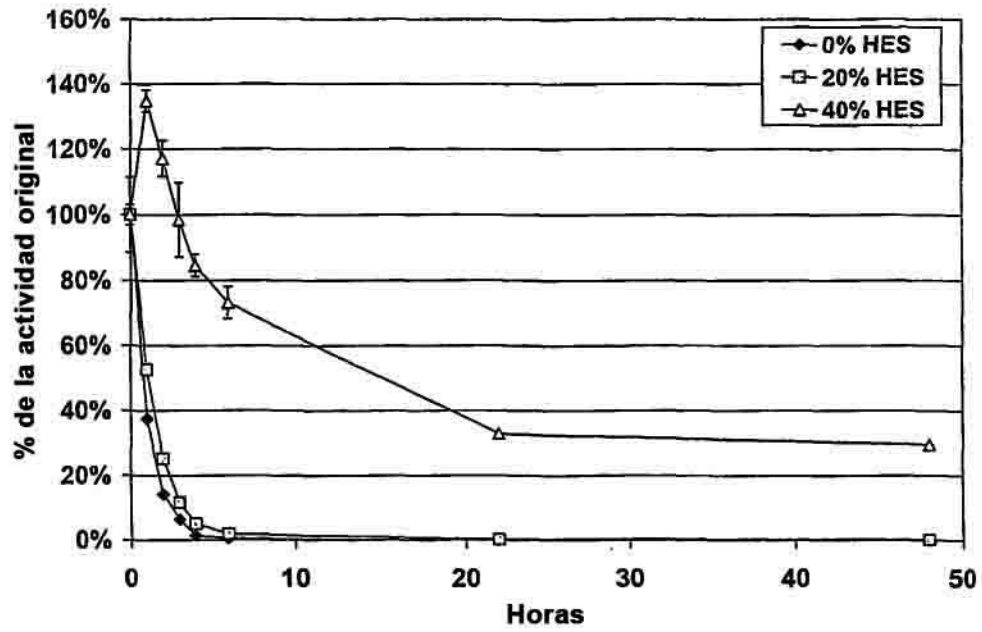


Fig. 7

Efecto del HES en la estimulación de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa

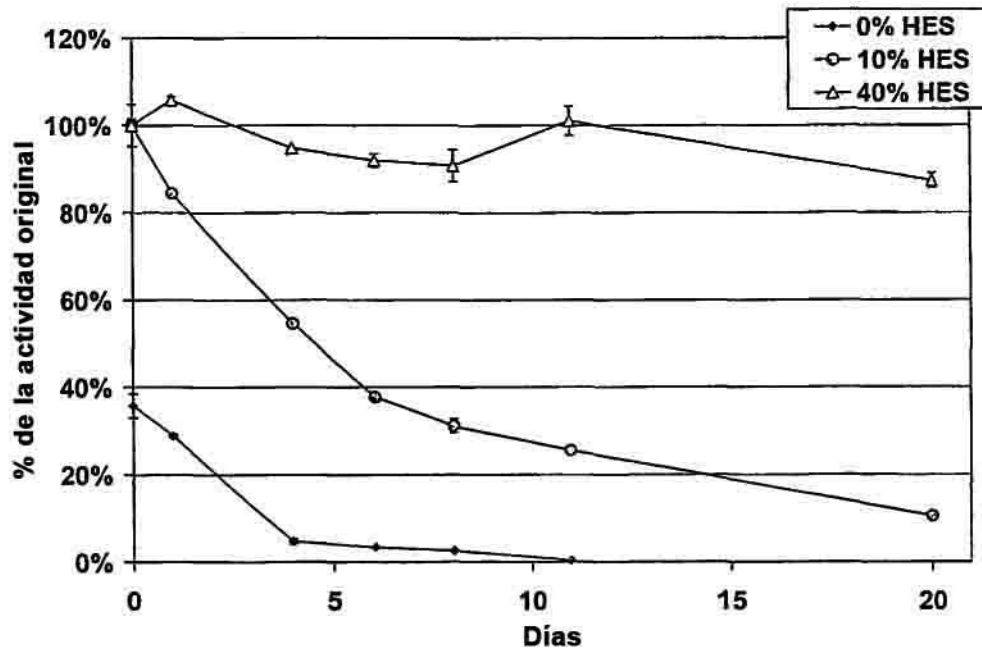


Fig. 8

Efecto del HES en la estimulación de la actividad de la  $\alpha$ -galactosidasa

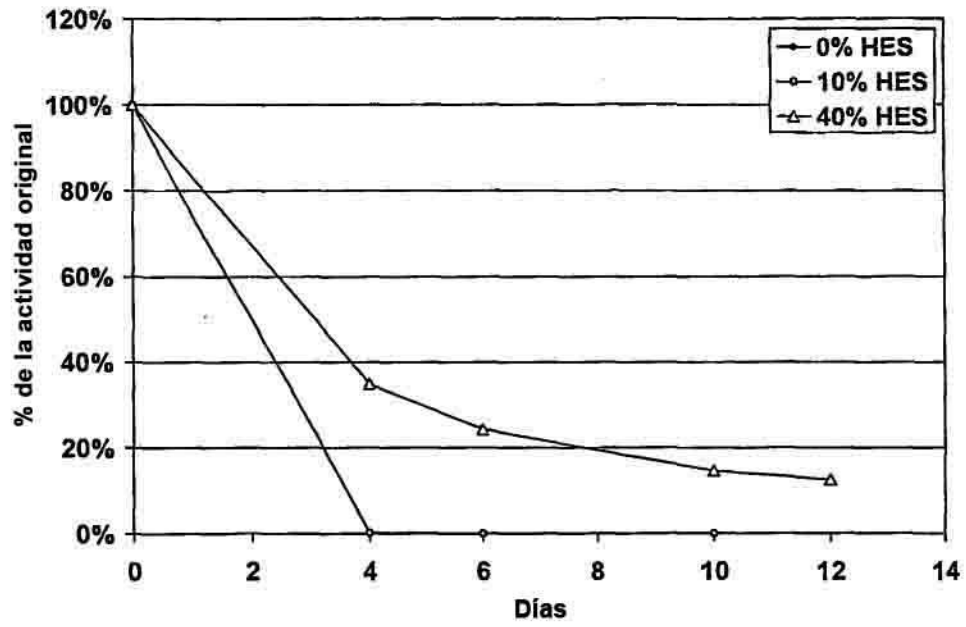


Fig. 9