

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 028**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003** **E 03783223 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013** **EP 1565209**

54 Título: **N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora, métodos de tratamiento usando dicha enzima y métodos para producir y purificar dicha enzima**

30 Prioridad:

07.11.2002 US 290908

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

27.02.2014

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
371 BEL MARIN KEYS BOULEVARD, SUITE 210
NOVATO, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**QIN, MINMIN;
HENSTRAND, JOHN, M.;
ZECHERLE, GARY, N.;
WENDT, DAN, J.;
CHAN, WAI-PAN;
CHEN, LIN;
FITZPATRICK, PAUL, A.;
STARR, CHRISTOPHER, M. y
SWIEDLER, STUART**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 445 028 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

N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora, métodos de tratamiento usando dicha enzima y métodos para producir y purificar dicha enzima

Campo de la invención

La presente invención se encuentra en el campo de la medicina clínica, la bioquímica y la biología molecular. La presente invención presenta agentes terapéuticos y métodos para tratar la mucopolisacaridosis VI así como procedimientos de producción y purificación para producir tales agentes terapéuticos.

Antecedentes de la invención

La MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico en la que los pacientes afectados carecen de la enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB). La enzima metaboliza el resto sulfato del glicosaminoglicano (GAG) sulfato de dermatano (Neufeld, *et al.*, "The mucopolysaccharidoses" The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver *et al.*, New York:McGraw-Hill, 1989, págs. 1565-1587). En ausencia de la enzima, se bloquea la degradación gradual del sulfato de dermatano y el sustrato se acumula intracelularmente en el lisosoma en una amplia variedad de tejidos. La acumulación produce un trastorno progresivo con implicación de múltiples órganos y tejidos en el que el bebé parece normal en el nacimiento, pero habitualmente muere antes de la pubertad. El diagnóstico de MPS VI se realiza habitualmente a los 6-24 meses de edad cuando los niños muestran desaceleración progresiva del crecimiento, hígado y bazo agrandados, deformidades esqueléticas, rasgos faciales indeterminados, obstrucción de las vías aéreas superiores y deformidades articulares. Pueden desarrollarse opacificación progresiva de la córnea, hidrocefalia comunicante o enfermedad cardíaca en niños con MPS VI. Habitualmente la muerte resulta de infección respiratoria o enfermedad cardíaca. A diferencia de la MPS I, la MPS VI normalmente no se asocia con afectación progresiva del estado mental, aunque las limitaciones físicas pueden afectar al aprendizaje y el desarrollo. Aunque la mayoría de los pacientes con MPS VI tienen la forma grave de la enfermedad que habitualmente es letal hacia la adolescencia, se han descrito pacientes afectados con una forma menos grave de la enfermedad que pueden sobrevivir durante décadas.

Varias publicaciones proporcionan estimaciones de la incidencia de MPS VI. Un estudio de 1990 de British Columbia de todos los nacimientos entre 1952 y 1986 publicado por Lowry *et al.* (Lowry, *et al.*, Human Genet 85:389-390 (1990)) estima una incidencia de sólo 1:1.300.000. Un estudio austriaco (Meikle *et al.*, JAMA 281(3):249-54) de los nacimientos entre 1980-1996 encontró 18 pacientes para una incidencia de 1:248.000. Un estudio en Irlanda del Norte (Nelson, *et al.*, Hum. Genet. 101:355-358 (1997)) estimó una incidencia de 1:840.000. Finalmente, un estudio de los Países Bajos de 1970-1996 calculó una prevalencia de 0,24 por 100.000 (Poorthuis, *et al.*, Hum. Genet. 105:151-156 (1999)). Basándose en estos estudios, se estima que hay entre 50 y 300 pacientes en los EE.UU. a los que se ha diagnosticado con todas las formas de este síndrome.

No hay tratamiento satisfactorio para la MPS VI aunque algunos pacientes se han beneficiado de trasplante de médula ósea (BMT) (Krivit, *et al.*, N. Engl. J. Med. 311(25):1606-11 (1954); Krivit, *et al.*, Int. Pediat. 7:47-52 (1992)). El BMT no está disponible de manera universal por la falta de un donante adecuado y se asocia con morbilidad sustancial. El Grupo Europeo para Trasplante de Médula Ósea notificó mortalidad relacionada con el trasplante del 10% (HLA idéntico) al 20-25% (HLA erróneo) para 63 casos de trasplante de trastornos lisosómicos (Hoogerbrugge, *et al.*, Lancet 345: 1398-1402 (1995)). Aparte del BMT, la mayoría de los pacientes reciben tratamiento sintomático por problemas específicos como única forma de atención. Un objeto de la presente invención es proporcionar terapia de sustitución enzimática con *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB). No se han realizado intentos para tratar seres humanos con rhASB. Asimismo, no se han proporcionado formulaciones médicas ni dosificaciones clínicas aceptables. Se han realizado varios ensayos de sustitución enzimática del modelo felino de MPS VI. El documento WO01/83722 se refiere a un método de purificar ASB. Gibson *et al.* Biochem. J. (1987) 248, 755-764 enseñan una purificación inicial de ASB a partir de homogeneizados de hígado humano y anticuerpos monoclonales específicos frente a ASB. Anson *et al.* Biochem. J. (1992) 284, 789-794 dan a conocer corrección de fibroblastos de mucopolisacaridosis de tipo VI humanos con *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa.

Sumario de la invención

La presente invención engloba la producción, purificación y el uso de una composición que comprende una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa altamente purificada en forma de precursor. El ADN y la secuencia codificada de aminoácidos de la forma precursora se exponen en las SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. Se prevé que la secuencia señal son los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 2, y la producción recombinante ha dado como resultado un producto que comienza en el residuo de aminoácido o bien 39 o bien 40 de la SEQ ID NO: 2.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora producida mediante un proceso de perfusión, en la que dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora tiene una pureza al menos igual al o mayor del 99,5% basándose en la proteína total, en la que dicha pureza se mide usando el método de fase inversa (RP-HPLC) y en la que la composición está libre

de bandas detectables de aproximadamente 47-48 kDa tras la electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con tinción de Coomassie.

En un segundo aspecto, la presente invención presenta usos novedosos de tratamiento de enfermedades y composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas en su totalidad o en parte por una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB). En este sentido, la presente invención da a conocer la composición farmacéutica según la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad producida en su totalidad o en parte por una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa y el uso de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora que tiene una pureza al menos igual al o mayor del 99,5% basándose en la proteína total según la presente invención, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad producida en su totalidad o en parte por una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa. El sujeto padece una enfermedad producida en su totalidad o en parte por una deficiencia de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa. Las realizaciones preferidas incluyen optimizar la dosificación a las necesidades del organismo que va a tratarse, preferiblemente mamíferos o seres humanos, para mejorar eficazmente los síntomas de la enfermedad. En realizaciones preferidas, la enfermedad es mucopolisacaridosis VI (MPS V1) o síndrome de Maroteaux-Lamy.

Este segundo aspecto de la invención proporciona específicamente composiciones para su uso en el tratamiento de seres humanos que padecen enfermedades producidas en su totalidad o en parte por una deficiencia en la actividad de ASB mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ASB humana, preferiblemente ASB humana recombinante. Por tanto, la invención contempla el uso de ASB humana en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia en la actividad de ASB, así como una composición farmacéutica que contiene ASB humana para su uso en el tratamiento de una deficiencia en la actividad de ASB. La deficiencia en la actividad de ASB puede observarse, por ejemplo, como niveles de actividad del 50% o menos, el 25% o menos o el 10% o menos en comparación con los niveles normales de actividad de ASB y puede manifestarse como una mucopolisacaridosis, por ejemplo mucopolisacaridosis VI (MPS V1) o síndrome de Maroteaux-Lamy. La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para proporcionar un efecto beneficioso en el paciente humano y preferiblemente proporciona mejoras en uno cualquiera de los siguientes: movilidad, dolor o rigidez articular, ya sea subjetiva u objetivamente; tolerancia o resistencia al ejercicio, por ejemplo, tal como se mide por la capacidad para caminar o subir; función pulmonar, por ejemplo, tal como se mide mediante FVC, FEV1 o FET; agudeza visual; o actividades de la vida diaria, por ejemplo, tal como se mide por la capacidad para levantarse desde la posición sentada, ponerse o quitarse ropa o recoger pequeños objetos. La ASB humana se administra preferiblemente como una preparación recombinante altamente purificada tal como se describe en el presente documento. Las preparaciones preferidas contienen rhASB con una pureza mayor del 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9%, tal como se mide mediante HPLC de fase inversa. Las preparaciones preferidas también contienen la forma precursora de ASB a alta pureza, de modo que las formas procesadas de ASB no se detectan en SDS-PAGE con tinción de Coomassie. Lo más preferiblemente, la pureza de la forma precursora de ASB es mayor del 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9%, tal como se mide mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC)-HPLC. La ASB humana también se formula preferiblemente con un tensioactivo o detergente no iónico tal como se describe en el presente documento, excluyendo opcionalmente una formulación con polioxietilensorbitano 20 u 80 al 0,001%.

Se ha encontrado que la administración de rhASB a dosis por debajo de 1 mg/kg por semana, por ejemplo a 0,2 mg/kg por semana, tiene un efecto beneficioso. La invención contempla dosis de al menos 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg o 1,5 mg/kg por semana, y puede oscilar hasta 2 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg o superior por semana. La dosis preferida es de 1 mg/kg/semana. Tales dosis se suministran preferiblemente una vez a la semana, pero opcionalmente pueden dividirse en cantidades iguales a lo largo de periodos de tiempo más frecuentes tales como bisemanales o diarios. Se contempla una variedad de vías de administración parenterales o no parenterales, incluyendo oral, transdérmica, transmucosa, intrapulmonar (incluyendo mediante aerosol), intramuscular, subcutánea o intravenosa que suministran dosificaciones equivalentes. También se contempla específicamente la administración mediante inyección en bolo o infusión directamente en las articulaciones o el LCR, tal como vía intratecal, intracerebral, intraventricular, a través de punción lumbar o a través de la cisterna magna. Se conoce en la técnica una variedad de medios para lograr tal administración intratecal, incluyendo bombas, depósitos, derivaciones o implantes. Preferiblemente, las dosis se suministran a través de infusiones intravenosas que duran 1, 2 ó 4 horas, lo más preferiblemente 4 horas, pero también pueden suministrarse mediante un bolo intravenoso.

También se contemplan otros medios de aumentar la actividad de ASB en los sujetos humanos, incluyendo terapia génica que hace que el paciente aumente de manera transitoria o permanente la expresión de ABS exógena o endógena. Es posible la transferencia de un gen de hASB exógeno o un promotor que aumente la expresión del gen de hASB endógeno a través de una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo vectores virales, recombinación homóloga, de inyección directa de ADN.

En un tercer aspecto, la presente invención presenta una composición farmacéutica que comprende *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora producida mediante un proceso de perfusión, en la que dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora tiene una pureza al menos igual al o mayor del 99,5% basándose en la proteína total, en la que dicha pureza se mide usando el método de fase inversa (RP-HPLC) y en la que la composición está libre de bandas detectables de aproximadamente 47-48 kDa tras la electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS -PAGE) con tinción de Coomassie y un portador farmacéuticamente

aceptable. Tales composiciones pueden ser adecuadas para la administración en varias formas tales como administración parenteral, tópica, intranasal, mediante inhalación u oral. Dentro del alcance de este aspecto hay realizaciones que presentan secuencias de ácido nucleico que codifican para la totalidad o una parte de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) que puede administrarse *in vivo* a células afectadas con una deficiencia de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB).

En un cuarto aspecto, se da a conocer en el presente documento para referencia un método para producir una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento biológicamente activo, mutante o análogo de la misma en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente. En una realización amplia, el método comprende la etapa de transfectar un ADNc que codifica para la totalidad o una parte de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un mutante o análogo biológicamente activo de la misma en una célula adecuada para la expresión de la misma. En la realización preferida, las células se hacen crecer en un cultivo constante o continuo o en perfusión. En otra realización, las células se hacen crecer en un medio que carece de G418. En algunas realizaciones, se usa un ADNc que codifica para una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) completa, preferiblemente una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) humana. Sin embargo, en otras realizaciones, puede usarse un ADNc que codifica para un fragmento o mutante biológicamente activo de la misma. Específicamente, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácido mientras se conserve o potencie la actividad biológica de la enzima. En otras realizaciones preferidas, se usa un vector de expresión para transferir el ADNc a una célula o línea celular adecuada para la expresión del mismo. En una realización particularmente preferida, el ADNc se transfecta en una célula de ovario de hámster chino (CHO), tal como la línea celular CHO-K1. Aún en otras realizaciones preferidas, el procedimiento de producción comprende las siguientes etapas: (a) hacer crecer células transfectadas con un ADN que codifica para la totalidad o un fragmento o mutante biológicamente activo de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana en un medio de crecimiento adecuado hasta una densidad apropiada, (b) introducir las células transfectadas en un biorreactor, (c) suministrar un medio de crecimiento adecuado al biorreactor, y (d) separar las células transfectadas de los medios que contienen la enzima.

Se da a conocer una línea celular transfectada que presenta la capacidad para producir *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente. En una realización preferida, la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa es *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. En realizaciones preferidas, la presente invención presenta una línea celular de CHO recombinante tal como la línea celular CHO K1 que produce de manera estable y fiable cantidades de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma, que permite usar la enzima terapéuticamente. Especialmente preferida es la línea celular CHO-K1 transgénica denominada CSL4S-342. En algunas realizaciones preferidas, la línea celular transgénica contiene una o más copias de un constructo de expresión. Preferiblemente, la línea celular transgénica contiene aproximadamente 10 o más copias del constructo de expresión. En realizaciones incluso más preferidas, la línea celular expresa la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) recombinante o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma en cantidades de al menos aproximadamente 20-40 microgramos por 10^7 células por día.

Se dan a conocer vectores novedosos adecuados para producir *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente.

Se da a conocer *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) novedosa o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma producido según los métodos dados a conocer en el presente documento y presentes de ese modo en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente.

La actividad específica de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) está preferiblemente en el intervalo de 20-90 unidades, y más preferiblemente es mayor de aproximadamente 50 unidades por mg de proteína. En la realización preferida, la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa es *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora altamente purificada.

En un aspecto adicional, se da a conocer un método novedoso para purificar *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma.

Según una primera realización, se hace crecer una masa celular transfectada y se retira dejando la enzima recombinante. Los materiales exógenos normalmente deben separarse de la masa en bruto para evitar la incrustación de las columnas. Preferiblemente, el medio de crecimiento que contiene la enzima recombinante se hace pasar a través de una etapa de ultrafiltración. En otra realización preferida, el método para purificar la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora comprende: (a) obtener un fluido que contiene *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora; (b) reducir la actividad proteolítica de una proteasa en dicho fluido que puede escindir la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora, en la que dicha reducción no daña a dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora; (c) poner en contacto el fluido con una resina de cromatografía de interacción con el colorante azul Cibracon; (d) poner en contacto el fluido con una resina de cromatografía de quelación de cobre; (e) poner en contacto el fluido con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba con fenilo; (f) recuperar dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. Preferiblemente, las etapas (c), (d) y (e) pueden realizarse secuencialmente. Los expertos en la técnica aprecian fácilmente que una o más de las etapas de cromatografía

pueden omitirse o sustituirse, o que el orden de las etapas de cromatografía puede cambiarse. En otras realizaciones preferidas, el eluyente procedente de la columna de cromatografía final se ultrafiltra/diafiltra, y se realiza una etapa apropiada para eliminar cualquier virus restante. Finalmente, pueden realizarse etapas de esterilización apropiadas según se desee.

5

Descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un diagrama de flujo del método para producir una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana (ASB) según la presente invención.

10

La figura 2 proporciona un diagrama de flujo del método para purificar una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana (ASB) según el método de proceso discontinuo (tabla 14).

La figura 3 proporciona el diagrama de flujo del método para purificar una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana (ASB) según el método de proceso de perfusión (tablas 14 y 15).

15

Las figuras 4A-4C representan los resultados obtenidos para los cromatogramas de la columna Blue Sepharose (figura 4A), la columna Copper Chelating Sepharose (figura 4B) y la columna Phenyl Sepharose (figura 4C).

20

La figura 5 representa un gel en gradiente de poliacrilamida al 4-20% que muestra el resultado de un SDS-PAGE teñido con plata del método de purificación del proceso de perfusión (tablas 14 y 15).

Las figuras 6A-6F representan los resultados en geles de SDS en gradiente de poliacrilamida al 4-20% de las muestras siguientes: carril 1, patrones de peso molecular preteñidos de amplio espectro NEB (PM en kDa); carril 2, 5 µg de ASB del lote AS60001 (antiguo proceso discontinuo); carril 3, 5 µg de ASB del lote AP60109 UF4 (proceso de perfusión); carril 4, 5 µg de ASB del lote AP60109 UF10 (proceso de perfusión); carril 5, 5 µg de ASB del lote AP60109 UF15 (proceso de perfusión); carril 6, 5 µg de ASB del lote AP60109 AUF18 (proceso de perfusión); carril 7, 5 µg de ASB del lote AP60109 AUF22 (proceso de perfusión); carril 8, 5 µg de ASB del lote AP60109 AUF25 (proceso de perfusión); y carril 9, 5 µg de ASB del lote AP60109 AUF27 (proceso de perfusión): Los geles se tiñen o bien con Coomassie R-250 o bien teñidos con plata.

25

30

La figura 7A representa los resultados en geles de SDS en gradiente de poliacrilamida al 4-20% teñidos con plata. La figura 7B representa los resultados en geles de SDS en gradiente de poliacrilamida al 4-20% teñidos con Coomassie. Carril 1, lote AP60202 UF4; carril 2, lote AP60202 UF10; carril 3, lote AP60202 UF18; carril 4, lote AP60202 (BMK); carril 5, lote 102PD0139x B3; carril 6, lote 102PD0139x B5; carril 7, patrón de referencia de perfusión rhASB-202-002; carril 8, lote 102PD0139 P1; carril 9, lote 102PD0139 P2; y carril 10, patrón Mark 12 (PM en kDa).

35

Las figuras 8A-8C representan perfiles obtenidos para la columna Blue Sepharose (figura 8A), la columna Copper Chelating Sepharose (figura 8B) y la columna Phenyl Sepharose (figura 8C). En La figura 8B, se indica la actividad de actividad catepsina mediante la línea roja.

40

La figura 9A representa los resultados de geles de SDS en gradiente de poliacrilamida al 4-20% teñidos con plata. La figura 9B representa los resultados de las proteínas transferidas del gel de la figura 9A transferidas sobre nitrocelulosa y estudiadas con sonda mediante anticuerpos anti-rhASB. La figura 9C representa los resultados de las proteínas transferidas del gel de la figura 9A transferidas sobre nitrocelulosa y estudiadas con sonda mediante anticuerpos anti-catepsina. BioLabPreStain indica patrones de molecular peso (PM en kDa).

45

La figura 10 muestra niveles séricos de anticuerpo anti-ASB a lo largo de 96 semanas de tratamiento con rhASB en un estudio clínico de fase 1/2 en seres humanos.

50

La figura 11 muestra la reducción en los niveles en orina totales de GAG a lo largo de 96 semanas de tratamiento con rhASB en un estudio clínico de fase 1/2 en seres humanos.

La figura 12 muestra una comparación de niveles en orina de GAG en la semana 96 en seres humanos tratados con rhASB con niveles normales apropiados para la edad.

55

La figura 13 muestra la mejora en los resultados de prueba de marcha de 6 minutos a lo largo de 96 semanas de tratamiento con rhASB en un estudio clínico de fase 1/2 en seres humanos.

60

La figura 14 muestra niveles séricos de anticuerpo anti-ASB a lo largo de 48 semanas de tratamiento en un estudio clínico de fase 2 en seres humanos.

La figura 15 muestra la reducción en niveles en orina totales de GAG a lo largo de 48 semanas de tratamiento en un estudio clínico de fase 2 en seres humanos.

65

La figura 16 muestra una comparación de niveles en la semana 48 en seres humanos tratados con rhASB con niveles normales apropiados para la edad.

- 5 La figura 17 muestra la mejora en los resultados de la prueba de marcha de 12 minutos a lo largo de 48 semanas de tratamiento en un estudio clínico de fase 2 en seres humanos.

La figura 18 muestra la mejora en los resultados se subir escaleras 3 minutos a lo largo de 48 semanas de tratamiento en un estudio clínico de fase 2 en seres humanos.

- 10 La figura 19 muestra los resultados de la prueba cronometrada de levantarse y caminar a lo largo de 48 semanas de tratamiento en un estudio clínico de fase 2 en seres humanos.

- 15 Las figuras 20 y 21, respectivamente, muestran resultados de cuestionarios de dolor articular y rigidez articular a lo largo de 48 semanas de tratamiento en un estudio clínico de fase 2 en seres humanos.

Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención engloba una composición que comprende una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa altamente purificada en la forma precursora y usos de la misma. La pureza de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa en la forma precursora es al menos igual al, o mayor del 99,5, 99,6, 99,7 o 99,8% con respecto a la proteína total tal como se determina mediante el método de HPCL de fase inversa. Preferiblemente, la pureza es al menos igual al o mayor del 99,9%. La pureza de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora se mide usando el método de HPCL de fase inversa (véase el ejemplo 9). La pureza de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora es aquella por la que la
- 25 la composición está esencialmente libre de cualquier proteína celular contaminante o *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa degradada o madura o procesada que es detectable mediante el método de HPCL de fase inversa. Toda la pureza en porcentaje se basa en la proteína total tal como se determina mediante el método de HPCL de fase inversa. La alta pureza repetible de manera sistemática usando el proceso de purificación dado a conocer en el presente documento posibilita tratar a aquellos pacientes que requieren tratamiento a largo plazo, crónico con preparaciones de rhASB de alta pureza administradas en cualquier tratamiento, por ejemplo, semanalmente. Por tanto, la invención contempla administrar rhASB precursor de tal alta pureza a lo largo de un largo periodo de tiempo, por ejemplo 12 semanas, 24 semanas, 48 semanas, 96 semanas o más.

- 35 En un aspecto, la presente invención presenta usos o composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas en su totalidad o en parte por una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB). En una realización, este método presenta administrar una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) recombinante o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma sola o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, este método presenta transferir un ácido nucleico que codifica para la totalidad o una parte de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un mutante biológicamente activo de la misma a una o más células huéspedes *in vivo*. Las realizaciones preferidas incluyen optimizar la dosificación a las necesidades del organismo que va a tratarse, preferiblemente mamíferos o seres humanos, para mejorar eficazmente los síntomas de la enfermedad. En realizaciones preferidas, la enfermedad es mucopolisacaridosis VI (MPS VI), síndrome de Maroteaux-Lamy.

- 45 La pureza de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora es aquella por la que la composición está esencialmente libre de cualquier proteína celular contaminante que pueda producir una reacción inmunológica o alérgica en el sujeto al que va a administrarse *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. Una composición está esencialmente libre de tales proteínas celulares huéspedes contaminantes si la composición, cuando se administra a un sujeto, no produce ninguna reacción inmunológica o alérgica. La alta pureza de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora es importante para evitar una reacción inmunológica o alérgica en el sujeto a las impurezas presentes en la composición farmacéutica. Esto es especialmente cierto para las proteínas de las células a partir de las cuales se purifica la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. Cuando la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora recombinante se expresa y se purifica a partir de células de ovario de hámster chino, las proteínas de ovario de hámster chino pueden producir reacciones inmunológicas o alérgicas (por ejemplo urticaria) en el sujeto. El único
- 50 medio para evitar este tipo de reacción es garantizar que la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora es suficientemente pura de modo que las proteínas de ovario de hámster chino contaminantes no están en cantidad suficiente como para producir tal(es) reacción/reacciones. La pureza de la composición farmacéutica es especialmente importante ya que los sujetos incluyen pacientes que padecen MPS VI y por tanto ya están inmunológicamente comprometidos.

- 60 También preferiblemente, la pureza de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora (ASB) es tal que la composición tiene sólo cantidades traza de formas procesadas o degradadas. Las proteasas presentes en las células huésped escinden la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa en formas de peso molecular inferior. Aunque algunas de estas formas también pueden ser enzimáticamente activas, la forma precursora es preferible para la captación celular y el direccionamiento lisosómico y por tanto, es deseable una cantidad superior de ASB precursora no procesada en la preparación final. Además, las formas degradadas de ASB en el producto terminado también
- 65

pueden dar lugar a una incidencia o cantidades superiores de anticuerpos frente a la propia ASB, lo que es sumamente indeseable en casos tales como aquellos en los que se requiere terapia a largo plazo de los pacientes. El proceso de purificación por perfusión descrito en el presente documento da como resultado una preparación altamente pura que está esencialmente libre de proteínas de célula huésped contaminantes o formas procesadas/agregadas de ASB tal como se somete a ensayo mediante la combinación de SDS-PAGE, RPHPLC y SEC-HPLC. Cuando se administra a seres humanos, el producto producido mediante este proceso parece tener una semivida más larga.

La indicación para la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB) es para el tratamiento de MPS VI, también conocida como síndrome de Maroteaux-Lamy. Según las realizaciones preferidas, se proporciona una dosis inicial de 1 mg/kg (~50 U/kg) a pacientes que padecen una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa. Preferiblemente, la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa se administra semanalmente mediante inyección. Según otras realizaciones preferidas, los pacientes que no demuestran una reducción en excreciones urinarias de glicosaminoglicanos de al menos el cincuenta por ciento se cambian a una dosificación de 2 mg/kg (~100 U/kg) en el plazo de aproximadamente tres meses de la dosificación inicial. Preferiblemente, la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma se administra por vía intravenosa a lo largo de un periodo de aproximadamente cuatro horas una vez a la semana preferiblemente mientras que persistan síntomas clínicos significativos de la enfermedad. Además, preferiblemente, la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB) se administra mediante un catéter intravenoso colocado en la vena cefálica u otra vena apropiada con una infusión de solución salina comenzando a aproximadamente 30 cc/h. Además, preferiblemente la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB) se diluye en aproximadamente 250 cc de solución salina normal.

En un aspecto, la presente invención presenta composiciones farmacéuticas novedosas que comprenden *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana (rhASB) para tratar una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa.

La enzima recombinante puede administrarse de varias formas además de las realizaciones preferidas descritas anteriormente, tal como administración parenteral, tópica, mediante inhalación u oral. Otro aspecto es proporcionar la administración de la enzima formulándola con un portador farmacéuticamente aceptable que puede ser sólido, semisólido o líquido o una cápsula que pueda ingerirse. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen comprimidos, gotas tales como gotas nasales, composiciones para aplicación tópica tales como pomadas, gelatinas, cremas y suspensiones, aerosoles para inhalación, pulverizador nasal, liposomas. Habitualmente, la enzima recombinante comprende entre el 0,05 y el 99% o entre el 0,5 y el 99% en peso de la composición, por ejemplo entre el 0,5 y el 20% para composiciones destinadas a inyección y entre el 0,1 y el 50% para composiciones destinadas a administración oral.

Para producir composiciones farmacéuticas en esta forma de unidades de dosificación para aplicación oral que contienen una enzima terapéutica, la enzima puede mezclarse con un portador sólido, pulverulento, por ejemplo lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, un almidón tal como almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, polvo de laminaria o polvo de pulpa de limón, un derivado de celulosa o gelatina y también pueden incluir lubricantes tales como estearato de magnesio o calcio o un Carbowax u otras ceras de polietilenglicol y comprimirse para formar comprimidos o núcleos para grageas. Si se requieren grageas, los núcleos pueden recubrirse por ejemplo con disoluciones de azúcar concentradas que pueden contener goma arábica, talco y/o dióxido de titanio, o alternativamente con un agente de formación de película disuelto en disolventes orgánicos fácilmente volátiles o mezclas de disolventes orgánicos. Pueden añadirse colorantes a estos recubrimientos, por ejemplo, para distinguir entre contenido diferente de principio activo. Para la composición de cápsulas de gelatina blanda que consisten en gelatina y, por ejemplo, glicerol como plastificante, o cápsulas cerradas similares, el principio activo puede mezclarse con un Carbowax o un aceite adecuado como por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de oliva o aceite de cacahuete. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener granulados del principio activo con portadores sólidos, pulverulentos tales como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones tales como almidón de patata, almidón de maíz o amilopectina, derivados de celulosa o gelatina, y también pueden incluir estearato de magnesio o ácido esteárico como lubricantes.

Las enzimas terapéuticas de la presente invención también pueden administrarse por vía parenteral tal como mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, o bien mediante inyección individual o infusión de bomba o bien mediante implante subcutáneo de liberación sostenida, y las enzimas terapéuticas pueden administrarse mediante inhalación. En la inyección subcutánea, intramuscular e intravenosa, la enzima terapéutica (el principio activo) puede disolverse o dispersarse en un vehículo portador líquido. Para la administración parenteral, el material activo puede mezclarse de manera adecuada con un vehículo aceptable, preferiblemente de la variedad de aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y similares. También pueden usarse otros vehículos parenterales tales como composiciones orgánicas que usan solcetal, glicerol, formal y formulaciones parenterales acuosas.

Para la aplicación parenteral mediante inyección, las composiciones pueden comprender una disolución acuosa de una sal farmacéuticamente aceptable soluble en agua de los ácidos activos según la invención, de manera deseable en una concentración del 0,5-10%, y opcionalmente también un agente estabilizante y/o sustancias tampón en

disolución acuosa. Las unidades de dosificación de la disolución pueden incluirse ventajosamente en ampollas.

Quando se administran enzimas terapéuticas en forma de un implante subcutáneo, el compuesto se suspende o disuelve en un material dispersado lentamente conocido para los expertos en la técnica, o se administra en un dispositivo que libera lentamente el material activo a través del uso de una fuerza de accionamiento constante tal como una bomba osmótica. En tales casos, es posible la administración a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

Para la aplicación tópica, las composiciones farmacéuticas están de manera adecuada en forma de una pomada, célula, suspensión, crema o similar. La cantidad de principio activo puede variar, por ejemplo entre el 0,05 y el 20% en peso del principio activo. Tales composiciones farmacéuticas para aplicación tópica pueden prepararse de manera conocida mezclando el principio activo con materiales portadores conocidos tales como isopropanol, glicerol, parafina, alcohol estearílico, polietilenglicol, etc. El portador farmacéuticamente aceptable también puede incluir un potenciador de absorción química conocido. Ejemplos de potenciadores de absorción son, por ejemplo, dimetilacetamida (patente estadounidense n.º 3.472.931), tricloroetanol o trifluoroetanol (patente estadounidense n.º 3.891.757), determinados alcoholes y mezclas de los mismos (patente británica n.º 1.001.949). También se describe un material portador para aplicación tópica a piel intacta en la memoria descriptiva de la patente británica n.º 1.464.975, que da a conocer un material portador que consiste en un disolvente que comprende el 40-70% (v/v) de isopropanol y el 0-60% (v/v) de glicerol, siendo el resto, si lo hay, un constituyente inerte de un diluyente que no supera el 40% del volumen total de disolvente.

La dosificación a la que se administran las composiciones farmacéuticas que contienen la enzima terapéutica puede variar dentro de un amplio intervalo y dependerá de diversos factores tales como por ejemplo, la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, etc., y puede tener que ajustarse individualmente. Como posible intervalo para la cantidad de enzima terapéutica que puede administrarse por día puede mencionarse desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 2000 mg o desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 2000 mg.

Las composiciones farmacéuticas que contienen la enzima terapéutica pueden formularse de manera adecuada de modo que proporcionan dosis dentro de estos intervalos o bien como unidades de dosificación individuales o bien como unidades de dosificación múltiple. Además de contener una enzima terapéutica (o enzimas terapéuticas), las formulaciones objeto pueden contener uno o más sustratos o cofactores para la reacción catalizada por la enzima terapéutica en las composiciones. Las composiciones que contienen enzima terapéutica también pueden contener más de una enzima terapéutica. Asimismo, la enzima terapéutica puede estar en forma conjugada uniéndose a otro resto, por ejemplo PEG. Adicionalmente, la enzima terapéutica puede contener uno o más restos de direccionamiento o péptidos de tránsito para ayudar a suministrarse a un tejido, órgano u orgánulo de interés.

La enzima recombinante empleada en los métodos y composiciones objeto también puede administrarse por medio de la transformación de las células del paciente con ácidos nucleicos que codifican para la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma. La secuencia de ácido nucleico así codificante puede incorporarse en un vector para la transformación en células del paciente que va a tratarse. En el presente documento se describen realizaciones preferidas de tales vectores. El vector puede diseñarse para integrarse en los cromosomas del sujeto, por ejemplo, vectores retrovirales, o para replicarse de manera autónoma en las células huésped. Los vectores que contienen secuencias de nucleótidos de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa codificantes pueden diseñarse para proporcionar expresión continua o regulada de la enzima. Adicionalmente, el vector genético que codifica para la enzima puede diseñarse para integrarse de manera estable en el genoma celular o para estar presente sólo de manera transitoria. Puede aplicarse la metodología general de terapia génica convencional a secuencias de polinucleótido que codifican para *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa. Pueden encontrarse revisiones de técnicas de terapia génica convencional en Friedman, Science 244:1275-1281 (1989); Ledley, J. Inherit. Aletab. Dis.13:587-616 (1990); y Tososhev, *et al.*, Curr. Opinions Biotech. 1:55-61 (1990).

Un método particularmente preferido de administrar la enzima recombinante es por vía intravenosa. Una composición particularmente preferida comprende *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa recombinante, solución salina normal, tampón fosfato para mantener el pH a aproximadamente 5-7 y albúmina humana. La composición puede incluir adicionalmente polioxietilensorbitano, tal como polisorbato 20 u 80 (Tween-20 o Tween-80) para mejorar la estabilidad y prolongar la semivida. Alternativamente, la composición puede incluir cualquier tensioactivo o detergente no iónico conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a polioxietilensorbitano 40 ó 60; ésteres de ácido graso de polioxietileno; monoisoestearatos de polioxietilensorbitano; poloxámeros, tales como poloxámero 188 o poloxámero 407; octoxinol-9 u octoxinol 40.

Preferiblemente, el tensioactivo o detergente no iónico está presente a una concentración de al menos el 0,0001%, o al menos el 0,0005%, o al menos el 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004% o 0,005% (p/v). Preferiblemente, la concentración es la menor necesaria para lograr la estabilidad deseada, pero puede ser de hasta el 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,01% o 0,02% (p/v). Lo más preferiblemente, la composición comprende un polisorbato a una concentración del 0,005% ± 0,003% (por ejemplo del 0,002% al 0,008%). Estos componentes de la composición pueden proporcionarse preferiblemente en las siguientes cantidades:

<i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatasa	1-5 mg/ml o 50-250 unidades/ml
Disolución de cloruro de sodio	150 mM en una bolsa i.v., 50-250 cc de volumen total
Tampón fosfato de sodio	10-100 mM, pH 5,8, preferiblemente 10 mM
Albúmina humana, opcional	1 mg/ml
Tween-20 o Tween-80	0,001%-0,005% (p/v)

En una realización preferida, la ASB se formula como 1 mg/ml en NaCl 150 mM, NaPO₄ 10 mM, pH 5,8. polisorbato 80 al 0,005%.

- 5 En un aspecto, se da a conocer un método para producir *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente. En una realización amplia, el método comprende la etapa de transfectar un ADNc que codifica para la totalidad o una parte de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un mutante o análogo biológicamente activo de la misma en una célula adecuada para la expresión de la misma. En algunas realizaciones, se usa un ADNc que
- 10 codifica para una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) completa, preferiblemente una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) humana. Sin embargo, en otras realizaciones, puede usarse un ADNc que codifica para un fragmento o mutante biológicamente activo de la misma. Específicamente, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácido mientras se conserve o potencie la actividad biológica de la enzima.
- 15 En otras realizaciones preferidas, se usa un vector de expresión para transfectar el ADNc en una célula o línea celular adecuada para la expresión del mismo. En una realización particularmente preferida, el ADNc se transfecta en una célula de ovario de hámster chino, tal como la línea celular CHO-K1. En aún otras realizaciones preferidas, el procedimiento de producción comprende las siguientes etapas: (a) hacer crecer células transfectadas con un ADN que codifica para la totalidad o un fragmento o mutante biológicamente activo de una *N*-acetilgalactosamina-4-
- 20 sulfatasa humana un medio de crecimiento adecuado hasta una densidad apropiada, (b) introducir las células transfectadas en un biorreactor, (c) suministrar un medio de crecimiento adecuado al biorreactor, (d) recoger dicho medio que contiene la enzima recombinante y (e) retirar sustancialmente las células transfectadas del medio de recogida.
- 25 Un medio adecuado para hacer crecer las células transfectadas es un medio Excell 302 de JRH complementado con L-glutamina, glucosa e hipoxantina/timidina, opcionalmente con o sin G418. En un medio preferido, el medio Excell 302 de JRH se complementa adicionalmente con ácido fólico, serina y asparagina, y no hay G418 presente en el medio. El uso de este medio preferido para cultivar células proporciona una rhASB precursora de pureza superior en comparación con el uso del medio complementado con G418 pero no con ácido fólico, serina y asparagina (véase el
- 30 carril 2 de la figura 6). Se prefiere hacer crecer las células en un medio de este tipo para lograr una densidad celular de aproximadamente 1×10^7 células/ml que da como resultado 10-40 mg/ml de enzima activa. Además, es preferible hacer crecer las células transfectadas en un biorreactor durante aproximadamente de 5 a 15 días. Más preferiblemente, es aproximadamente 9 días. Preferiblemente, las células transfectadas se hacen crecer en un biorreactor usando un proceso basado en perfusión con recogidas que continúan hasta 35 días. Más
- 35 preferiblemente, las células transfectadas se hacen crecer en un biorreactor usando un proceso basado en perfusión con recogidas que continúan hasta 45 días. Incluso más preferiblemente, las células transfectadas se hacen crecer en un biorreactor usando un proceso basado en perfusión con recogidas que continúan hasta 60 días. Incluso mucho más preferiblemente, las células transfectadas se hacen crecer en un biorreactor usando un proceso basado en perfusión con recogidas que continúan hasta 90 días.
- 40 Según las realizaciones preferidas, las células transfectadas pueden retirarse sustancialmente del sobrenadante del biorreactor filtrándolas a través de membranas sucesivas tales como una membrana de 10 μ m seguida por una membrana de 1 μ m seguida por una de 0,2 μ m. Cualquier medio de recogida restante puede desecharse antes de la filtración.
- 45 La *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante puede producirse en células de ovario de hámster chino (Peters, *et al.* J. Biol. Chem. 265:3374-3381). Su captación está mediada por un receptor de manosa-6-fosfato de alta afinidad expresado en la mayoría, si no todas, las células (Neufeld *et al.*, "The mucopolysaccharidoses" The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver, *et al.* New York:McGraw-Hill (1989) págs. 1565-1587). Una vez
- 50 unida al receptor de manosa-6-fosfato, la enzima se somete a endocitosis a través de depresiones recubiertas y se transporta a los lisosomas. Al pH de los lisosomas, la enzima es activa y comienza eliminar residuos de sulfato procedentes del sulfato de dermatano acumulado. En los fibroblastos en MPS VI, el aclaramiento del almacenamiento es rápido y se demuestra fácilmente en el plazo de 92 horas de la exposición enzimática (Anson, *et al.*, J. Clin. Invest. 99:651-662 (1997)). La enzima recombinante puede producirse a una escala de fermentación de
- 55 110 l (volumen de trabajo de aproximadamente 90 l) según un proceso según el diagrama de flujo explicado resumidamente en la figura 1.

La enzima recombinante puede producirse usando el siguiente método tal como se expone en la tabla 1A-C.

Tabla 1A: Proceso de cultivo celular mediante el proceso discontinuo alimentado

Etapa	Proceso	Prueba en proceso
1. Descongelación del Banco de Células de Trabajo (WCB)	- Inocular las células descongeladas en un matraz T-75 con 25 ml de medio Exell 302 de JRF complementado con L-glutamina 4 mM, glucosa 4,5 g/l e hipoxantina/timidina 10 mg/l; complementado adicionalmente con ácido fólico, serina y asparagina (sin G418) - Cultivar durante 3 días para lograr una densidad de 1×10^{10} células	- Recuento celular - Viabilidad celular
	↓	
3. Matraz de agitación de 250 ml	- Añadir células a 175 ml de medio complementado (sin G418) - Cultivar durante 3 días	- Recuento celular - Viabilidad celular
	↓	
4. Matraz de agitación de 1 l	- Añadir células a 800 ml de medio complementado (sin G418) - Cultivar durante 1-2 días	- Recuento celular - Viabilidad celular
	↓	
5. Matraz de agitación de 8 l	- Añadir células a 4 l de medio complementado (sin G418) - Cultivar durante 1-2 días	- Recuento celular - Viabilidad celular
	↓	
6. 2 x Matraces de agitación de 8 l	- Dividir volumen de trabajo en 2 matraces de agitación de 8 l - Añadir células a 5,5 l de medio complementado (sin G418) a cada matraz de agitación de 8 l - Cultivar durante 1-2 días	- Recuento celular - Viabilidad celular
	↓	
7. Inoculación de biorreactor de 110 l	- Añadir células a 7 ml de medio complementado - Cultivar durante 9 días	- Recuento celular - Viabilidad celular
	↓	
8. Producción	Aproximadamente 9 días de crecimiento en biorreactor	- Recuento celular - Viabilidad celular - Actividad
	↓	
9. Recogida del sobrenadante	La recogida se bombea al interior de una bolsa de 100 l, refrigerada durante la noche	
	↓	
10. Retirada de células	Las células se retiran del medio de recogida mediante filtración a través de un cartucho de membrana de 10 μm seguido por cartuchos de 1 μm y 0,2 μm. Puesto que se ha permitido que las células sedimenten durante la noche, del 5 al 10% final del medio de recogida se descarta antes de la filtración.	- Punto de descarga de QC - Actividad - Carga biológica - Endotoxina - Micoplasmas - Agentes adventicios <i>in vitro</i>

En una realización, las células transfectadas se hacen crecer en un proceso de cultivo celular que es un proceso basado en perfusión con recogidas que continúan durante hasta 35 o más días con una tasa de recogida de aproximadamente 400 l por día de un biorreactor de 110 l. Preferiblemente, la tasa de recogida es de aproximadamente 800 l por día desde un biorreactor de 110 l. En la tabla 1B se muestra un diagrama de flujo del proceso que compara el proceso de cultivo celular por perfusión con el proceso de cultivo celular discontinuo. En la tabla 1C se resumen las comparaciones para el proceso discontinuo alimentado así como detalles de los cambios específicos implementados para el proceso de cultivo celular basado en perfusión.

Tabla 1B: Comparación del proceso de cultivo celular entre los procesos discontinuo alimentado y de perfusión

Proceso discontinuo	Proceso de perfusión
1 vial de Banco de Células de Trabajo (WCB)	1 vial de WCB
↓	↓
Matraz T de 75 cm ²	Matraz T de 75 cm ²
↓	↓
Matraz de agitación de 250 ml	Matraz de agitación de 250 ml
↓	↓
2 x Matraces de agitación de 250 ml	2 x Matraces de agitación de 250 ml
↓	↓
2 x Matraces de agitación de 3 l	2 x Matraces de agitación de 3 l
↓	↓
2 x Matraces de agitación de 8 l	2 x Matraces de agitación de 8 l
↓	↓
2 x biorreactores de 110 l (volumen de trabajo de 85-95 l) Modo discontinuo, 11-12 días	1 x biorreactor de 110 l (volumen de trabajo de 75-85 l) Modo discontinuo, 1-3 días 1 x biorreactor de 110 l (volumen de trabajo de 75-85 l) Duración del cultivo de hasta 35 días
↓	↓
Recogida almacenada en bolsas de polietileno de 200 l	Recogida almacenada en bolsas de polietileno de 200 l

Tabla 1C: Descripción resumen de las diferencias entre los procesos discontinuo alimentado y de perfusión

Etapas de producción	Descripción (discontinuo)	Descripción (perfusión)
CULTIVO CELULAR	Un lote es el resultado de una serie de producción con dos biorreactores de 110 l.	Cambio: Un lote es el resultado de una serie de producción con un biorreactor de 110 l
Descongelación del vial de WCB	Un vial por cada lote de producción: Pruebas: Viabilidad celular esperada > 95% Se esperan $\geq 1 \times 10^6$ células recuperadas	Cambio: Viabilidad celular: > 90% Una viabilidad > 90% en la descongelación ha demostrado producir series y producto satisfactorios que cumplen las especificaciones
↓		
Matraces T de 75 cm ²	Aproximadamente 5×10^6 células sembradas en 1 matraz. Duración de la etapa: ~ 3 días Pruebas: Viabilidad celular esperada > 90% Se esperan $\geq 2 \times 10^7$ células recuperadas	Sin cambios
↓		

Matraz de agitación de 250 ml	Las células de T75 se dividen en un matraz de agitación de 250 ml Duración de la etapa: ~ 2 días Pruebas: Viabilidad celular esperada > 90% Se esperan $\geq 2 \times 10^8$ células recuperadas	Sin cambios
↓		
2 x Matraces de agitación de 250 ml	Las células de 1 x matraz de agitación de 250 ml se dividen en dos matraces de agitación de 250 ml Duración de la etapa: ~ 3 días Pruebas: Viabilidad celular esperada > 90% Se esperan $\geq 4 \times 10^8$ células recuperadas	Sin cambios
↓		
2 x Matraces de agitación de 3 l	Las células de 2 x matraces de agitación de 250 ml se dividen en dos matraces de agitación de 3 l Duración de la etapa: ~ 4 días Pruebas: Viabilidad celular esperada > 90% Se esperan $\geq 4,8 \times 10^9$ células recuperadas	Sin cambios
↓		
2 x Matraces de agitación de 8 l	Las células de 2 x matraces de agitación de 3 l se dividen en dos matraces de agitación de 8 l Duración de la etapa: ~ 2 días Pruebas: Viabilidad celular esperada > 90% Se esperan $\geq 1,6 \times 10^{10}$ células recuperadas	Sin cambios
↓		
Inoculación de matraz de cultivo	Se añade un inóculo $\geq 0,8 \times 10^{10}$ células a cada uno de dos biorreactores que contienen 32 l de medio de cultivo cada uno. El cultivo se monitoriza con un sistema de control interconectado a PC	Cambio: Se añade un inóculo $\geq 1,6 \times 10^{10}$ células a un biorreactor que contiene 64 l de medio de cultivo. (Refleja el uso de un biorreactor frente a dos).
↓		

Producción	Crecimiento: 3 días de crecimiento hasta que el cultivo alcanza una densidad $> 3,2 \times 10^{10}$ células. División vertical: Medios de cultivo añadidos al volumen final de 95 l Recogida: Se recogió el sobrenadante en el día 11 o cuando la viabilidad celular disminuyó por debajo del 70%. Se filtra y se almacena el sobrenadante	Cambios: Crecimiento/Transición/Recogida: Cuando la densidad celular alcanza $> 8 \times 10^{10}$ células/ml, se inicia la perfusión. La tasa de perfusión se aumenta gradualmente hasta 5 volúmenes de recipiente por día basado en los niveles de glucosa. Cuando la densidad celular es $> 1,28 \times 10^{12}$, se ajusta el punto de ajuste de pH a 7,35. Una vez que cesan los aumentos en las tasas de perfusión, se mantiene el nivel de glucosa reduciendo la densidad celular con una purga de células. Se recupera y se filtra el sobrenadante recogido.
Terminación	Se termina la serie en la recogida	Cambio: Se termina la serie una vez alcanzados 35 o más días, o la actividad disminuye por debajo de 2 mg/l durante tres días consecutivos o una vez que se ha recuperado sobrenadante recogido adecuado.

La preparación del inóculo para el proceso de ampliación a escala es la misma para los procesos discontinuo alimentado y de perfusión. En una realización, se inicia el cultivo de células con rhASB descongelando un único vial del Banco de Células de Trabajo y transfiriendo su contenido (aproximadamente 1 ml) a aproximadamente 25 ml de medio EX-CELL 302 (modificado con L-glutamina, sin rojo fenol) en un matraz de cultivo celular T de 75 cm². En cada etapa de expansión, se incuba el cultivo celular hasta que se logra un recuento de células viables de aproximadamente $0,8 \times 10^6$ células/ml. Se monitoriza cada etapa de expansión de células para determinar el crecimiento celular (densidad celular) y la viabilidad celular (a través de exclusión con azul de tripano). Todas las adiciones de medio EX-CELL 302 (modificado con L-glutamina, sin rojo fenol) y transferencias de células se realizan asépticamente en una campana de flujo laminar. Se expande el cultivo celular secuencialmente del matraz T de 75 cm² a un matraz de agitación de 250 ml, a dos matraces de agitación de 250 ml, a dos matraces de agitación de 3 l y finalmente a dos matraces de agitación de 8 l. Todo el proceso de ampliación a escala dura aproximadamente 14 días. Cuando los dos matraces de agitación de 8 l están a una densidad de al menos $1,0 \times 10^6$ células/ml, se usan los frascos para sembrar un biorreactor de 110 l.

Se prefiere que las operaciones del biorreactor para la expresión o producción o fabricación de rhASB utilicen un proceso de cultivo celular basado en perfusión. Preferiblemente, el biorreactor, que usa el proceso de perfusión, puede controlar densidades celulares de hasta 37 millones de células por ml, en comparación con 4-5 millones de células por ml usando el proceso discontinuo alimentado.

El proceso basado en perfusión tarda más (35 días) que el proceso discontinuo alimentado (11-12 días) y produce un volumen mayor de fluido de cultivo celular recogido (aproximadamente 400 l/día a una tasa de perfusión de 5 volúmenes de recipiente por día) en comparación con el proceso discontinuo alimentado (190 l/serie). Preferiblemente, la recogida se realiza hasta 35 días para una recuperación total de aproximadamente 8400 l de sobrenadante.

Se evalúa el final de las células de producción (EPC) para determinar la estabilidad genética, identidad, esterilidad y contaminación por agente adventicio según la directriz de la ICH. Preferiblemente, los resultados de EPC, obtenidos a partir de una serie en biorreactor de 35 días de duración, AC60108, producido en condiciones de cGMP, no muestran crecimiento ni resultados negativos ni detección de la presencia de bacterias y hongos, micoplasmas, contaminantes virales adventicios, virus murinos o contaminantes o partículas similares.

Se da a conocer una línea celular transgénica que presenta la capacidad para producir *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente.

En realizaciones preferidas, la presente invención presenta una línea celular de ovario de hámster chino recombinante tal como la línea celular CHO K1 que produce de manera estable y fiable cantidades de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) que permiten usar la enzima terapéuticamente. Se prefiere especialmente la línea celular CHO-K1 designada CSL4S-342. En algunas realizaciones preferidas, la línea celular contiene uno o más de un constructo de expresión. Más preferiblemente, la línea celular contiene aproximadamente 10 o más copias del constructo de expresión. En realizaciones incluso más preferidas, la línea celular expresa *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa recombinante (ASB) en cantidades de al menos aproximadamente 20-80 ó 40-80 microgramos por 10^7 células por día.

La *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB) puede producirse a partir de una línea celular CHO-K1 (ovario de hámster chino) transfectada estable designada CSL4S-342. La línea celular de describe en la

bibliografía (Crawley, J.Clin.Invest. 99:651-662 (1997)). Se prepararon el Banco de Células Maestro (MCB) y el Banco de Células de Trabajo (WBC) en Tektagen Inc. (Malvern, PA). Los bancos de células se han caracterizado por las directrices recomendadas de la ICH para una línea celular recombinante de mamífero.

- 5 Se dan a conocer vectores novedosos adecuados para producir *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente.

- 10 En otro aspecto, se da a conocer la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma producida según los métodos de la presente invención y por tanto presente en cantidades que permiten usar la enzima terapéuticamente.

- 15 La actividad específica preferida de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) según la presente invención es de aproximadamente 20-90 unidades y más preferiblemente mayor de 50 unidades por miligramo de proteína. Preferiblemente, la enzima tiene un peso desglicosilada de aproximadamente 55 a 56 kDa, lo más preferiblemente de aproximadamente 55,7 kDa. Preferiblemente, la enzima tiene un peso glicosilada de aproximadamente 63 a 68 kDa, lo más preferiblemente de aproximadamente 64 a 66 kDa. La presente invención también incluye fragmentos biológicamente activos incluyendo moléculas truncadas, análogos y mutantes de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana que se produce de manera natural.

- 20 El ADNc humano para la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa prevé una proteína de 533 aminoácidos con un péptido señal de 41 aminoácidos (Peters, *et al.* J. Biol. Chem. 265:3374-3381). El peso molecular previsto es de aproximadamente 55,9 kDa tras la escisión del péptido señal. La enzima recombinante tiene un peso molecular aparente de 64 kDa en SDS-PAGE debido a modificaciones de hidratos de carbono. La secuencia de proteína prevista contiene seis posibles sitios de modificación de oligosacárido unidos a N de los que cuatro pueden usarse basándose en una masa promedio de 2.000 kDa y una diferencia de 8.000 kDa entre la masa prevista y la aparente. Una forma madura de la proteína intracelular tiene tres péptidos unidos mediante enlaces de cistina. El péptido más grande tiene un peso molecular de 47 kDa; los otros dos tienen un peso molecular de 6 y 7 kDa, respectivamente.

- 30 En la tabla 2 se proporciona una descripción de un producto terminado producido y purificado según los métodos de la presente invención.

Tabla 2: Especificaciones preliminares del producto terminado

Prueba	Procedimiento	Especificación
Actividad	Ensayo de fluorescencia	20.000 – 120.000 mUnidades
Virus adventicios*	Ensayo <i>in vivo</i>	Pasa
Aspecto	Visual	Disolución transparente, de incolora a amarillo claro
Endotoxina bacteriana	LAL	≤ 2 EU/ml
Cloruro	Absorción atómica	Notificar valor
Ensayo de captación de fibroblastos con ASB	TBD	≤ 40 nmol
Micoplasmas*	Puntos a considerar 1993	Pasa
Materiales particulados	USP	≤ 600/vial a 25 µm y ≤ 6000/vial a 10 µm
pH	USP	5,5-6,8
Fosfato	Absorción atómica	Notificar resultado
Concentración de proteínas	UV 280	0,8 - 1,2 mg/ml
Pureza	SDS-PAGE	1 banda principal entre 65 – 70 kDa
	RP-HPLC	> 95%
Colorante azul residual	TBD	Notificar valor
Cobre residual	TBD	Notificar valor
Sodio	Absorción atómica	Notificar valor
Actividad específica	Cálculo	40.000 – 80.000 mUnidades/mg

Esterilidad	21 CFR 610	Pasa
-------------	------------	------

*Sometido a prueba en el sobrenadante recogido del biorreactor (tras la eliminación de células por filtración).

En un séptimo aspecto, la presente invención presenta un método novedoso para purificar *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ASB) o un fragmento, mutante o análogo biológicamente activo de la misma. Según una primera realización, se hace crecer una masa celular transfectada y se retira dejando la enzima recombinante. Los materiales exógenos normalmente deben separarse de la masa en bruto para evitar la incrustación de las columnas. Preferiblemente, el medio de crecimiento que contiene la enzima recombinante se hace pasar a través de una etapa de ultrafiltración. En un método, la disolución filtrada se hace pasar a través de una columna de cromatografía de DEAE Sepharose, luego una columna de cromatografía de Blue Sepharose, luego una columna de cromatografía de Cu⁺⁺ Chelating Sepharose y luego una columna de cromatografía de Phenyl Sepharose. Una cromatografía en columna de cuatro etapas de este tipo que incluye el uso de una columna de cromatografía de DEAE Sepharose, una de Blue Sepharose, una de Cu⁺⁺ Chelating Sepharose y una de Phenyl Sepharose secuencialmente da como resultado especialmente una enzima recombinante altamente purificada. Los expertos en la técnica aprecian que pueden omitirse o sustituirse una o más etapas de cromatografía, o alterarse el orden de las etapas dentro del alcance de la presente invención. En otras realizaciones preferidas, el eluyente de la columna de la cromatografía final se ultrafiltra/diafiltra, y se realiza una etapa apropiada para eliminar cualquier virus restante. Finalmente, pueden realizarse etapas de esterilización apropiadas según se desee. La enzima recombinante puede purificarse según un proceso explicado resumidamente en la figura 2. La calidad de la enzima recombinante es clave para los pacientes. La rhASB producida mediante este método es sustancialmente pura (> 95%).

En una realización preferida, la etapa de ultrafiltración/diafiltración se realiza con una disolución de fosfato de sodio de aproximadamente 10 mM y con una disolución de cloruro de sodio de aproximadamente 100 mM a un pH de aproximadamente 7,3. En otra realización, la etapa de cromatografía de DEAE Sepharose se realiza a un pH de aproximadamente 7,3 en la que la disolución eluida se ajusta con un tampón apropiado, preferiblemente un tampón cloruro de sodio y fosfato de sodio. En realizaciones preferidas adicionales, la etapa de cromatografía de Blue Sepharose se realiza a un pH de aproximadamente 5,5 en la que la disolución eluida se ajusta con un tampón apropiado, preferiblemente un tampón cloruro de sodio y acetato de sodio. Además, en realizaciones preferidas, la etapa de cromatografía de Cu⁺⁺ Chelating Sepharose se realiza con un tampón de elución que incluye cloruro de sodio y acetato de sodio. En realizaciones especialmente preferidas, se realiza una segunda etapa de ultrafiltración/diafiltración en el eluato de las series de cromatografía en la que la enzima recombinante se concentra hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/ml en una formulación tampón tal como un tampón de cloruro de sodio y fosfato de sodio a un pH de aproximadamente 5,5 a 6,0, lo más preferiblemente a un pH de 5,8. El tampón fosfato es un tampón preferido usado en el proceso porque el tampón fosfato evita la degradación crítica y mejora la estabilidad de la enzima.

En la tabla 3 se expone una descripción más detallada de métodos de purificación particularmente preferidos dentro del alcance de la presente invención.

Tabla 3: Resumen del proceso de purificación

Etapa	Proceso
1. UF/DF	El fluido recogido filtrado (HF) se concentra diez veces y luego se diafiltra con 5 volúmenes de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF).
	↓
2. DEAE Sepharose FF (flujo a través)	• Tampón de prelavado 1: NaOH 0,1 N • Tampón de prelavado 2: NaPO₄ 100 mM pH 7,3 • Tampón de equilibrado: NaCl 100 mM, NaPO₄ 100 mM pH 7,3 • Carga: Producto de la etapa 1 • Tampón de lavado: NaCl 100 mM, NaPO₄ 100 mM pH 7,3 • Tampón de separación: NaCl 1 M, NaPO₄ 10 mM pH 7,3 • Tampón de desinfección: NaOH 0,5 N • Tampón de almacenamiento: NaOH 0,1 N
	↓
3. Blue Sepharose FF	• Prelavado 1: NaOH 0,1 N

	• Prelavado 2: H₂O • Prelavado 3: NaAc 1 M, pH 5,5 • Tampón de equilibrado: NaCl 150 mM, NaAc 20 mM pH 5,5 • Carga: Flujo a través de DEAE • Tampón de lavado: NaCl 150 mM, NaAc 20 mM, pH 5,5 • Tampón de elución: NaCl 500 mM, NaAc 20 mM pH 5,5 • Tampón de regeneración: NaCl 1 M, NaAc 20 mM pH 5,5 • Tampón de desinfección: NaOH 0,1 N, 0,5-2 horas • Tampón de almacenamiento: ETOH al 20% NaCl 500 mM, NaAc 20 mM, pH 5,5
	↓
4. Cu ⁺⁺ Chelating Sepharose FF	• Tampón de desinfección: NaOH 0,1 N • Tampón de lavado: H₂O • Tampón de carga: Sulfato de cobre 0,1 M • Tampón de equilibrado: NaAc 20 mM, NaCl 0,5 M, glicerol al 10%, pH 6,0 • Carga: Eluato de Blue Sepharose • Tampón de lavado 1: NaAc 20 mM, NaCl 0,5 M, glicerol al 10%, pH 6,0 • Tampón de lavado 2: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, glicerol al 10%, pH 4,0 • Tampón de lavado 3: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, glicerol al 10%, pH 3,8 • Tampón de elución: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, glicerol al 10%, pH 3,6 • Tampón de separación: EDTA 50 mM, NaCl 1 M • Tampón de desinfección: NaOH 0,5 N, 0,5-2 horas • Tampón de almacenamiento: NaOH 0,1 N
	↓
5. Phenyl Sepharose HP	• Tampón de prelavado 1: NaOH 0,1 N • Tampón de prelavado 2: H₂O • Tampón de equilibrado: NaCl 3 mM, NaAc 20 mM, pH 4,5 • Carga: Eluato de Cu⁺⁺ Chelating Sepharose • Tampón de lavado 1: NaCl 3,0 M, NaAc 20 mM, pH 4,5 • Tampón de lavado 2: NaCl 1,5 M, NaAc 20 mM, pH 4,5 • Tampón de elución 1: NaCl 1,0 M, NaAc 20 mM, pH 4,5 • Tampón de separación: NaCl 0 M, NaAc 20 mM, pH 4,5 • Tampón de desinfección: NaOH 0,5 N • Tampón de almacenamiento: NaOH 0,1 N
	↓
6. UF/DF	La rhASB purificada se concentra y diafiltra hasta una concentración final de 1,5 mg/ml en tampón de formulación (NaCl 150 mM, NaPO ₄ 10 mM, pH 5,8) usando un sistema de TFF.
	↓

7. Formulación (si es necesario)	• Diluir con tampón de formulación adicional hasta 1,0 mg/ml
	↓
8. Reducción viral/filtración estéril	• Filtración en 0,02 µm en recipiente estéril
	↓
9. Disposición en vial	• Producto lleno en viales de vidrio de 5 cc de tipo 1, cerrados manualmente, apretados y etiquetados.

El principio activo a granel formulado puede esterilizarse a través de un filtro de 0,04 micrómetros o preferiblemente de 2 micrómetros en una campana de flujo laminar de clase 100 en viales de vidrio de tipo 1. Los viales pueden llenarse hasta un volumen final de aproximadamente 5 ml usando una máquina de llenado de líquido semiautomática. Entonces los viales pueden taparse, sellarse y etiquetarse.

Un método más preferido para purificar una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora comprende: (a) obtener un fluido que contiene *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora; (b) reducir la actividad proteolítica de una proteasa en dicho fluido que puede escindir la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora, en el que dicha reducción no daña a dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora; (c) poner en contacto el fluido con una resina de cromatografía de interacción con el colorante azul Cibracon; (d) poner en contacto el fluido con una resina de cromatografía de quelación de cobre; (e) poner en contacto el fluido con una resina de cromatografía de interacción hidrófoba con fenilo; y (f) recuperar dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. De manera preferible, las etapas (c), (d) y (e) se realizan secuencialmente. Este método requiere no más de tres etapas o columnas de cromatografía. Con el fin de obtener *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora altamente purificada, no se requieren etapas o columnas de cromatografía adicionales. Este método no comprende que el fluido se ponga en contacto con una resina de DEAE Sepharose. La *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora recuperada tiene una pureza al menos igual al o mayor del 99%. El rendimiento de recuperación global puede ser de al menos aproximadamente el 40-60%.

Preferiblemente, obtener el fluido que contiene la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora comprende hacer crecer un cultivo de células transformadas con un gen que codifica para *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa; preferiblemente, el gen codifica para la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana. Preferiblemente, las células son células de mamífero. Más preferiblemente, las células de mamífero son células de ovario de hámster chino. La etapa de obtención puede comprender adicionalmente recoger el fluido de dicho cultivo de células. La etapa de obtención puede comprender además concentrar dicho fluido hasta aproximadamente 20x.

Una característica de este método es una separación temprana de la actividad proteasa y la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. Esta separación puede comprender o bien (1) la reducción, inhibición o inactivación de la actividad proteasa, o bien (2) la separación física de la(s) proteasa(s) de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora. Preferiblemente, esta separación se produce lo antes posible durante el proceso de purificación. El fin es mantener a un mínimo el número de moléculas de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora que se están escindiendo para dar lugar a la forma madura o procesada y/u otra(s) forma(s) degradada(s). La forma precursora de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa es la forma preferida, en contraposición a la forma madura o procesada, porque se capta más fácilmente en el tejido diana y por el posterior direccionamiento al lisosoma. Cuanto antes se separe la actividad proteasa de la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora menor será el número de moléculas de la forma precursora que se escindirá en la forma madura o procesada.

La actividad de la proteasa se reduce o inhibe ajustando el fluido hasta un valor de pH de entre aproximadamente 4,8 y 8,0. Preferiblemente, el valor de pH está entre aproximadamente 4,8 y 5,5. Más preferiblemente, el valor de pH está entre aproximadamente 4,8 y 5,2. La actividad proteasa específica que se desea reducir es la actividad proteasa que escinde específicamente la forma precursora de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa en las formas maduras o procesadas. La actividad proteasa se encuentra en una o más cisteína proteasas. Una cisteína proteasa que escinde específicamente *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora es cathepsina L. Esta cathepsina L tiene un peso molecular de aproximadamente 36 kDa en su forma inactiva que se convierte en sus formas activas de 21-29 kDa en tamaño tras la exposición a pH inferior a 5,0 (véase la figura 9C). El pH puede ajustarse a cualquier valor por el que la(s) proteasa(s) no se convierte(n) de su forma activa a su forma inactiva y la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora deseada, o actividad biológica de la misma, no resulta dañada o dañada irreversiblemente.

Preferiblemente, la etapa (c) comprende hacer pasar el fluido a través de una columna de cromatografía de interacción con colorante azul Cibracon. Más preferiblemente, la columna de cromatografía de interacción con colorante azul Cibracon es una columna Blue Sepharose 6 Fast Flow. Preferiblemente, la etapa (d) comprende hacer pasar el fluido a través de una columna de cromatografía de quelación de cobre. Más preferiblemente, la columna de cromatografía de quelación de cobre es una columna Chelating Sepharose Fast Flow. Preferiblemente, la etapa (e) comprende hacer pasar el fluido a través de una columna de cromatografía de interacción hidrófoba con

fenilo. Más preferiblemente, la columna de cromatografía de interacción hidrófoba con fenilo es una columna Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub. Preferiblemente, la secuencia temporal de las etapas (c), (d) y (e) es etapa (c), etapa (d) y etapa (e).

- 5 La etapa de recuperación puede comprender ultrafiltración y/o diafiltración del fluido. La recuperación puede comprender filtrar el fluido para eliminar el ADN y/o filtrar el fluido para eliminar virus. La filtración, para eliminar virus, puede comprender hacer pasar dicho fluido a través de un filtro de 0,02 μm .

- 10 Este método también puede usarse para purificar una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa o fragmento, análogo o mutante biológicamente activo de la misma.

- 15 La pureza de rhASB se mide o determina usando una cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa ("RP-HPLC"), que separa proteínas basándose en diferencias de hidrofobicidad. Este ensayo usa una columna C4 (Fenomenex Jupiter) como la fase estacionaria y un gradiente de agua:acetonitrilo como la fase móvil. Las muestras de proteína se inyectan inicialmente en la columna en agua; en estas condiciones, todas proteínas se unirán a la columna. Entonces se infunde una concentración creciente gradualmente de acetonitrilo a través de la columna. Este gradiente de acetonitrilo aumenta la hidrofobicidad de la fase móvil, hasta el punto en el que las proteínas individuales se vuelven solubles en la fase móvil y se eluyen de la columna. Estos tiempos de elución son reproducibles de manera precisa para cada proteína individual en una mezcla. Las proteínas se detectan como picos en un cromatograma mediante absorbancia ultravioleta a 210 nm. Se calculan las áreas de cada pico y la pureza de la muestra puede calcularse como la razón del área de pico de rhASB con respecto al área total de todos los picos en el cromatograma. RP-HPLC es un método reproducible, con alta resolución demostrada, de determinar la pureza de rhASB.

- 25 Los estudios antes de esta solicitud indican que la pureza de ASB se determinaba realizando un ELISA de proteínas de impureza. Este método de usar ELISA de proteínas de impureza (cuyos detalles no se dan a conocer) probablemente usaba anticuerpos surgidos frente a una mezcla de posibles proteínas de impureza de la célula huésped. El ELISA se realizaría probablemente usando una curva patrón de la misma mezcla de posibles proteínas de impureza usada para generar los anticuerpos. Las muestras de prueba probablemente se cuantificarían para determinar los niveles de impureza, con respecto a esta mezcla patrón. Estos ensayos son herramientas valiosas en la purificación de proteínas, pero son menos precisos que la RP-HPLC para determinar la pureza del producto por los siguientes motivos:

- 35 (1) En el ensayo de RP-HPLC, las proporciones de rhASB y las impurezas se determinan ambas mediante la misma medición (absorbancia UV). En el ELISA, la concentración de impurezas se determina mediante la unión a anticuerpos mientras que el contenido en proteína objetivo se determina mediante otro método de ensayo (habitualmente absorbancia UV o Bradford). El valor de "pureza en porcentaje" debe calcularse como la razón de dos cantidades con las mismas unidades, determinadas experimentalmente mediante el mismo método.

- 40 (2) Para que el ELISA funcione bien, la muestra detectada por el anticuerpo debe tener la misma composición de proteínas que el patrón. Esto es muy improbable que sea el caso en un ELISA de proteínas de impureza. El patrón de ensayo para este tipo de ensayo sería una mezcla de muchas proteínas individuales, frente a la que se generan anticuerpos. Sin embargo, sólo un pequeño subconjunto de proteínas de impureza debe estar presente en el producto de rhASB purificado. Por tanto, el reactivo de anticuerpo estará detectando ahora una mezcla diferente de proteínas, y la respuesta frente al patrón probablemente será bastante no lineal. Cuando esto ocurre, el ensayo produce un valor neto diferente para cada dilución de muestra, por lo que no se sabe qué dilución (si la hay) está dando el valor correcto.

- 50 (3) Además, no todas las posibles proteínas de impureza son inmunogénicas o inmunogénicas con el mismo grado en animales tales como conejos, usados para generar los anticuerpos. Por tanto, el nivel de impureza determinado mediante ELISA puede no reflejar un subconjunto de las impurezas presentes en los productos purificados. Es completamente posible tener una o más impurezas principales en el producto que sean totalmente indetectables. En cambio, RP-HPLC detecta todas las proteínas porque la absorbancia UV es una propiedad universal de las moléculas de proteína.

- 55 (4) Finalmente, hay dos tipos de impurezas en un producto terminado purificado: impurezas no relacionadas con el producto (proteínas de células huésped tal como se comentó anteriormente) e impurezas relacionadas con el producto (productos de degradación incluyendo agregados y formas procesadas). Estas últimas no pueden detectarse por el ELISA de impureza pero pueden detectarse fácilmente mediante RP-HPLC.

- 60 Por tanto, los números reales obtenidos a partir del ELISA de proteínas de impureza son cuestionables y los números de RP-HPLC se basan en una base más firme.

- 65 Además, el análisis de SDS-PAGE permite la detección tanto de impurezas de células huésped como de formas procesadas o degradadas del producto de proteína terminado deseado. Cuando se usa conjuntamente con inmunotransferencia de tipo Western, las impurezas no relacionadas con el producto procedentes de contaminantes

de la célula huésped pueden diferenciarse de las impurezas relacionadas con el producto. Finalmente, SEC-HPLC permite un nivel de cuantificación de impurezas relacionadas con el producto porque puede detectar impurezas de pesos moleculares diferentes, incluyendo formas procesadas o degradadas de peso molecular inferior de la proteína así como monómeros, dímeros y otros multímeros.

5

En la tabla 4 se representa una realización de este método de purificación.

Tabla 4: Método de purificación

Etapas	Proceso
Filtración de producto recogido	■ Filtración a través de filtros de clarificación, filtros de 0,45 µm y finalmente filtro de 0,2 µm. ■ Los productos recogidos combinados filtrados se almacenan en bolsas de polipropileno
Concentración por UF	■ Equilibrado y purgado: fosfato de sodio 100 mM, pH 7,3 ■ Carga: Fluido recogido filtrado ■ Concentración: Concentración hasta 20X ■ Filtración: Filtrar el producto diluido a través de un filtro de 0,2 µm en un recipiente de almacenamiento
Ajuste del pH y filtración	■ Ajuste del pH: añadir ácido acético glacial al 10% a concentrados 20X combinados hasta un pH final igual o inferior a aproximadamente 7,3; preferiblemente, el pH es aproximadamente de 4,0 a 7,3; más preferiblemente, el pH es aproximadamente de 4,5 a 5,5; incluso más preferiblemente, el pH es aproximadamente de 5,0 ■ Carga: Concentrados 20X combinados ■ Aclarado: Agua para inyección (WFI) ■ Filtración a través de filtros de clarificación y filtro de 0,2 µm. ■ Purgado: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 120 mM, pH 5,0 ■ El rendimiento de recuperación puede ser de al menos aproximadamente el 83%
Columna de cromatografía de interacción con colorante azul Cibracon (Blue Sepharose 6 FF) (Blue, Blue Sepharose)	■ Prelavado: hidróxido de sodio 0,1 N ■ Lavado: Agua para inyección (WFI) ■ Equilibrado: Fosfato de sodio 10 mM, el pH es inferior a aproximadamente 6,5; preferiblemente, el pH es aproximadamente de 5,0 a 6,5; más preferiblemente, el pH es aproximadamente de 6,45 ■ Carga: Concentrados 20X combinados filtrados y con pH ajustado ■ Lavado: Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,45 ■ Elución: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 6,45 ■ Regeneración: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 6,45 ■ Desinfección: Hidróxido de sodio 0,1 N ■ Lavado 1: Agua para inyección (WFI) ■ Lavado 2: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 6,45 ■ Almacenamiento: Etanol al 20% ■ El rendimiento de recuperación puede ser de al menos aproximadamente el 84%
Columna de cromatografía de quelación de cobre (Chelating Sepharose FF) (Copper, CC, Copper Chelating)	■ Prelavado: Hidróxido de sodio 0,1 N ■ Lavado: Agua para inyección (WFI) ■ Tampón de carga: Sulfato cúprico 0,1 M ■ Equilibrado: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, el pH es inferior a aproximadamente 6,0; preferiblemente, el pH es aproximadamente de 3,6 a 5,5; más preferiblemente, el pH es aproximadamente de 5,5 ■ Carga: Ajustar el contenido en glicerol de los eluatos de Blue combinados hasta el 10%, añadiendo acetato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 2,0 M, glicerol al 50%, pH 5,2 ■ Lavado 1: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 5,5 ■ Lavado 2: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,9 ■ Elución: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,6 ■ Eluato mantenido durante 30-120 minutos antes del ajuste a pH 4,5 con NaOH 0,5 M ■ Regeneración: EDTA 50 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 8,0 ■ Desinfección: Hidróxido de sodio 0,5 M ■ Almacenamiento: Hidróxido de sodio 0,1 M ■ El rendimiento de recuperación puede ser de al menos aproximadamente el 86%

Columna de cromatografía de interacción hidrófoba con fenilo (Phenyl Sepharose 6 FF High Sub) (Phenyl, Phenyl High Sub)	■ Prelavado: Hidróxido de sodio 0,1 N ■ Lavado: Agua para inyección (WFI) ■ Equilibrado: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2,0 M, el pH es aproximadamente de 4,5 a 7,1; preferiblemente el pH es aproximadamente de 4,5 ■ Carga: Ajustar el contenido de cloruro de sodio del eluato de Copper hasta 2 M, añadiendo acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 5 M, pH 4,5 ■ Lavado 1: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 7,1 ■ Lavado 2: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 4,5 ■ Elución: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5 ■ Regeneración: Acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 ■ Desinfección: Hidróxido de sodio 0,5 N ■ Almacenamiento: Hidróxido de sodio 0,1 N ■ El rendimiento de recuperación puede ser de al menos aproximadamente el 88%
UF/DF, filtración de ADN, filtración viral, formulación	■ Equilibrado: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8 ■ Concentración: Concentración hasta NMT 1,5 mg/ml ■ Diafiltración: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8 ■ Filtración de ADN: Producto filtrado a través de un filtro de ADN ■ Filtración/dilución viral: producto filtrado a través de un filtro de 0,02 µm y diluido hasta 1,0 mg/ml ■ Formulación: Se añade polisorbato 80 a una concentración de 50 µg/ml ■ Filtración: filtrar el producto diluido a través de un filtro de 0,2 µm en un recipiente de almacenamiento

En la tabla 5 se exponen los componentes del producto terminado así obtenidos. En la tabla 6 se exponen los componentes de la composición de producto terminado dentro del alcance de la presente invención

5 Tabla 5: Componentes del producto terminado

Componente	Descripción
Principio activo	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante
Excipientes	Fosfato de sodio, monobásico, 1H ₂ O
	Fosfato de sodio, dibásico, 7 H ₂ O
	Cloruro de sodio
Recipiente	Vial de vidrio transparente de 5 ml de tipo I, Kimble Glass, borosilicato West pharmaceuticals, tapón gris S-127 4432150

Tabla 6: Composición de producto terminado

Componente	Cantidad
rhASB	1 mg/ml
Fosfato de sodio, monobásico, 1H ₂ O	9 mM
Fosfato de sodio, dibásico, 7 H ₂ O	1 mM
Cloruro de sodio	150 mM

10 Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar la invención objeto a modo de ilustración, no a modo de limitación.

Ejemplo 1

Evaluación clínica con N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante

15

Sumario

20

La indicación para N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB) es el tratamiento de MPS VI, también conocido como síndrome de Maroteaux-Lamy. Se propone un programa de desarrollo clínico para rhASB que consiste en un ensayo clínico abierto inicial que proporcionará una evaluación de infusiones semanales de la enzima para determinar la seguridad, la farmacocinética y la respuesta inicial de criterios de valoración clínicos tanto definidos como de sustitución. Se realizará el ensayo durante un mínimo de tres meses para recoger suficiente información de seguridad en 5 pacientes evaluables. En este momento, si la dosis inicial de 1 mg/kg no produce una reducción razonable de los glicosaminoglicanos en orina en exceso o produce un beneficio clínico directo

significativo, se doblará la dosis y se mantendrá durante tres meses adicionales para establecer la seguridad y para evaluar la eficacia adicional.

Objetivos

El objetivo principal es demostrar la seguridad de una infusión semanal de rhASB en pacientes con MPS VI durante un periodo de como mínimo tres meses. Las mediciones de seguridad incluirán acontecimientos adversos, respuesta inmunitaria y reacciones alérgicas (activación del complemento, formación de anticuerpos frente a enzima recombinante), panel de química clínica completo (función renal y hepática), análisis de orina y CBC con fórmula leucocítica.

Un objetivo secundario es evaluar la eficacia monitorizando cambios en diversos parámetros que se sabe que están alterados en MPS VI. Estos incluyen una prueba de marcha de seis minutos (como medida de tolerancia al ejercicio), evaluación de la función pulmonar completa (PFP), reducción en niveles de glicosaminoglicanos en orina y hepatomegalia (como medidas del almacenamiento de GAG en riñones e hígado), velocidad de crecimiento, amplitud de movimiento articular, cuestionario de evaluación de salud infantil (*Children's Health Assessment Questionnaire*) (CHAQ), agudeza visual, función cardíaca, estudios del sueño y dos evaluaciones globales diferentes; una realizada por el investigador, una realizada por el paciente/profesional sanitario. Un segundo objetivo secundario es determinar los parámetros farmacocinéticos del fármaco administrado mediante infusión en la circulación, y la distribución general y la semivida de la enzima intracelular usando leucocitos y tejido bucal como fuentes de tejido. Se prevé que estas mediciones ayudarán a relacionar la dosis con la respuesta clínica basándose en los niveles de enzima suministrados a los lisosomas de las células.

Métodos

Se llevará a cabo un estudio abierto, en un solo centro, para demostrar la seguridad y para evaluar los parámetros clínicos de tratamiento con rhASB en pacientes con MPS VI. Se ingresará a los pacientes para una evaluación de nivel inicial de dos semanas que incluirá una historia médica y un examen físico, pruebas psicológicas, pruebas de esfuerzo (cinta rodante), un conjunto convencional de pruebas clínicas de laboratorio (CBC, Panel 20, CH50, UA), una exploración de IRM o TAC del cuerpo (determinación volumétrica del hígado y del bazo, evaluación de hueso y médula ósea y tamaño de los ganglios linfáticos y de las amígdalas), una evaluación cardiológica (ecocardiograma, ECG, CXR), una evaluación de las vías respiratorias (pruebas de la función pulmonar), un estudio del sueño para evaluar acontecimientos obstructivos durante el sueño, un análisis de restricción articular (se medirá la amplitud de movimiento en las articulaciones de los codos y entre las falanges), una PL (punción lumbar) con presión del SNC, y estudios bioquímicos (actividad de N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa bucal en dos ocasiones, actividad de N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa de leucocitos en dos ocasiones, GAG en orina en tres ocasiones, generación sérica para ELISA de anticuerpos anti-rhASB y orina de 24 horas para determinar el aclaramiento de creatinina). Además de las evaluaciones anteriores, se fotografiará a cada paciente y se le grabará en vídeo realizando algunos movimientos físicos tales como intentar alzar las manos sobre sus cabezas y caminar. Se ajustará la dosis de los pacientes con antihistamínicos de modo que el pretratamiento con estos agentes pueda emplearse eficazmente antes de la infusión de la enzima. Se administrará la dosis humana propuesta de 1 mg/kg (50 U/kg) semanalmente mediante infusión por vía i.v. a lo largo de 4 horas. El paciente permanecerá en el hospital durante las primeras dos semanas, seguido por breves estancias durante las siguientes cuatro semanas. Se realizará el tratamiento durante las seis semanas finales en un centro cercano a la residencia del paciente. Los pacientes volverán al hospital para una evaluación completa a los tres meses. Si se requiere un aumento de dosis hasta 2 mg/kg, los pacientes seguirán el mismo calendario explicado anteriormente durante las primeras doce semanas. En cualquiera de los dos casos, también se realizará una evaluación completa a los 6 meses desde el momento de entrar en el ensayo. Se monitorizará la seguridad a lo largo de todo el ensayo. Los pacientes que completen el ensayo continuarán en terapia siguiendo un protocolo prolongado durante tanto tiempo como las condiciones de seguridad y eficacia lo garanticen hasta la aprobación de BLA.

Número de pacientes y tasa de inclusión

Se incluirá un único paciente al inicio del ensayo, con dos pacientes adicionales un mes más tarde y dos pacientes más dos semanas más tarde excluyendo cualquier complicación imprevista relacionada con el tratamiento. Se admitirán a pacientes adicionales si cualquiera de los pacientes incluidos enferma de manera crítica, o si un niño necesita un procedimiento clínico agudo para estados potencialmente mortales o perjudiciales.

Diagnóstico y criterios de inclusión/exclusión

El paciente puede ser hombre o mujer, de cinco años o mayor con un diagnóstico documentado de MPS VI confirmado mediante signos y síntomas clínicos medibles de MPS VI, y apoyado por un nivel de actividad de la enzima ASB de fibroblastos o leucocitos disminuido. Las pacientes en edad fértil deben tener una prueba de embarazo negativa ($\square$ -hCG en orina) justo antes de cada dosificación y se les debe aconsejar que usen un método anticonceptivo médicamente aceptado a lo largo de todo el estudio. Se excluirá un/a paciente de este estudio si el/la paciente se ha sometido previamente a trasplante de médula ósea; está embarazada o en estado de lactancia; ha

recibido un fármaco experimental en el plazo de 30 días antes de la inclusión en el estudio; o tiene un estado médico, enfermedad intercurrente grave, u otra circunstancia atenuante que pueda disminuir significativamente el cumplimiento del estudio.

5 Dosis, vía y régimen

Los pacientes recibirán rhASB a una dosis de 1 mg/kg (~50 U/kg) durante los primeros 3 meses del estudio. En el caso de que no se disminuyan los GAG en orina en exceso en una cantidad razonable y no se observe beneficio clínico, se doblará la dosis. Se producirá un aumento de dosis solamente después de que los 5 pacientes se hayan sometido a 3 meses de terapia. Se administrará esta forma de dosificación de rhASB por vía intravenosa a lo largo de aproximadamente un periodo de cuatro horas una vez a la semana durante un mínimo de 12 semanas consecutivas. Se colocará un catéter intravenoso periférico en la vena cefálica u otra vena apropiada y se comenzará una infusión de solución salina a 30 cc/h. Se medicará previamente al paciente con hasta 1,25 mg/kg de difenilhidramina por vía i.v. basándose en experimentos de ajuste de la dosis completados antes del ensayo. Se diluirá rhASB en 100 cc de solución salina normal complementada con albúmina humana 1 mg/ml. Se administrará mediante infusión la enzima diluida a 1 mg/kg (aproximadamente 50 unidades por kg) a lo largo de un periodo de 4 horas con monitorización cardiorrespiratoria y pulsioximetría. Se monitorizará clínicamente a los pacientes así como para determinar cualquier reacción adversa a la infusión. Si se observa cualquier síntoma inusual, incluyendo pero sin limitarse a malestar, disnea, hipoxemia, hipotensión, taquicardia, náuseas, escalofríos, fiebre y dolor abdominal, se detendrá la infusión inmediatamente. Basándose en los síntomas y signos clínicos, puede administrarse una dosis adicional de difenilhidramina, oxígeno con mascarilla, un bolo de fluidos por vía i.v. u otras intervenciones clínicas apropiadas tales como tratamiento con esteroides. Si se produce una reacción aguda, se someterá a prueba una evaluación para determinar el consumo de complemento en el suero. Se usará un segundo sitio por vía i.v. para la toma de muestras requeridas para el análisis farmacocinético.

25 Pacientes evaluables

Los datos de cualquier paciente dado se considerarán evaluables siempre que no falten más de dos infusiones no secuenciales durante las 12 semanas de terapia. Deben completarse las evaluaciones iniciales, en el punto medio y finales.

Seguridad

Se determinará que la terapia enzimática es segura si no se producen reacciones agudas significativas que no puedan impedirse alterando la tasa de administración de la enzima, o el uso de antihistamínicos o esteroides agudo. Se determinará que la administración a largo plazo de la enzima es segura si no se observan anomalías significativas en los exámenes clínicos, pruebas clínicas de laboratorio u otros estudios apropiados. No se considerará peligrosa por sí misma la presencia de anticuerpos o activación del complemento, pero tales anticuerpos requerirán monitorización mediante ELISA y mediante evaluaciones clínicas de posible enfermedad de los complejos inmunitarios.

Eficacia

Un fin de este estudio es evaluar posibles criterios de valoración para el diseño de un ensayo fundamental. Se espera que las mejoras en los criterios de valoración clínicos y de sustitución sean resultado del suministro de la enzima y la eliminación del almacenamiento de glicosaminoglicanos del cuerpo. Se llevará a cabo un aumento de dosis si los niveles de glicosaminoglicano en orina en exceso medios no se reducen en una cantidad razonable a lo largo de tres meses y no se observa beneficio clínico significativo a los 3 meses. Se espera que las mejoras sean comparables a las observadas en el ensayo clínico de MPS I completado recientemente y deberían incluir índice de las vías respiratorias mejorado o resolución de la apnea del sueño, movilidad articular mejorada y aumento de la resistencia.

Ejemplo 2

A continuación se presenta una revisión exhaustiva de la información disponible para gatos con MPS VI y estudios farmacológicos y toxicológicos relevantes: Se ha establecido la terapia de sustitución enzimática como un tratamiento prometedor para una variedad de trastornos metabólicos heredados tales como enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y mucopolisacaridosis I. En algunos de estos trastornos, un modelo de animal natural ofrece la capacidad de predecir la eficacia clínica del tratamiento humano durante estudios preclínicos. Se encontró que esto era cierto en MPS I (modelo canino). Teniendo esto en cuenta, se han realizado estudios con gatos con MPS VI antes del comienzo de estudios en seres humanos para esta enfermedad. Existen suficientes datos de seguridad y eficacia para continuar con un ensayo clínico en pacientes con MPS VI humanos.

Los estudios de gatos con MPS VI de rhASB indican que no ha muerto ningún gato como resultado de la administración del fármaco. Tal como se predijo, los experimentos en gatos con MPS VI también indican que la captación de rhASB depende de la presencia de cadenas laterales de hidratos de carbono modificadas con manosa-

6-fosfato. También se ha mostrado que rhASB en gatos con MPS VI aclara el almacenamiento de una variedad de órganos principales y altera moderadamente la densidad ósea. Los estudios de eficacia de dosis variable a largo plazo sugieren que una dosis de 1 mg/kg/semana es la concentración más baja para observar beneficios clínicos significativos. También se han realizado estudios para comparar la distribución de la enzima, el aclaramiento del almacenamiento de glicosaminoglicanos tisular y la disminución de los niveles de glicosaminoglicano en orina tras infusión en bolo y lenta (2 horas). Los estudios en progreso continúan evaluando la seguridad de infusiones semanales de la dosis clínica proyectada de 1 mg/kg de rhASB en gatos que padecen MPS VI.

En la década de 1970 se identificó una forma espontánea de MPS VI en varias familias de gatos siameses (Jezyk, Science 198:834-36 (1977)), y se han publicado informes detallados de los cambios patológicos en estos animales (Haskins, *et al.*, Am. J. Pathol. 101:657-674 (1980); Haskins, *et al.*, J. Am. Vet. Med. Assoc. 182:983-985 (1983); Konde, *et al.*, Vet. Radiol. 28:223-228 (1987)). Aunque la presentación clínica de estos gatos es un tanto variable, todos ellos muestran cambios generales que se han notificado en la bibliografía (Jezyk, *et al.*, Science 198:834-36 (1977); Konde, *et al.*, Vet. Radiol. 28:223-228 (1987); Crawley, "Enzyme replacement therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI" tesis de PhD, Universidad de Adelaida, Adelaida, S. Australia, (1998)). Se ha construido la tabla 6 a partir de estas fuentes para proporcionar los cambios "promedio" que se esperaría observar en un gato con MPS VI no tratado:

Tabla 7: modelo de gato con MPS VI

Observación clínica	Momento de aparición	Cambios en relación con la enfermedad humana (independientemente del tiempo)
• Dismorfia facial: • Cabeza pequeña, • Maxilar ancho, • Orejas pequeñas	2 meses	• Similar a la enfermedad humana
• Opacificación difusa de la córnea	2 meses	• Similar a la enfermedad humana
• Anomalías óseas: • Displasia epifisaria • Subluxaciones • Pectus excavatum	Primeros signos a los 2 meses-progresivo	• Similar a la enfermedad humana-alteraciones en la calcificación endocondral
• Peso corporal reducido	3 meses	• Similar a la enfermedad humana
• Flexibilidad de la columna vertebral cervical	El valor normal de los gatos es de 180° en todas las edades En MPS VI: 3 meses: 130-170° 5 meses: 45-130° 6 meses: 30-100° 11 meses: 20-80°	• Similar a la enfermedad humana
• Osteoporosis/enfermedad articular degenerativa	1 año o más	• Similar a la enfermedad humana
• Defectos en el modo de andar con las extremidades posteriores • Parálisis o paresia de las extremidades posteriores (compresiones en la médula toracolumbar)	Véase la tabla a continuación	• Síndrome del túnel carpiano • Subluxación en C₁-C₂ • Compresión de la médula cervical secundaria a una duramadre engrosada más típica
• Hígado y bazo normales a simple vista		• Hígado y bazo agrandado en seres humanos
• Válvulas cardíacas engrosadas		• Similar a la enfermedad humana
• Sin lesiones en el SNC-agrandamiento leve del ventrículo lateral		• Puede compararse con hidrocefalia en la enfermedad humana

Otras determinaciones bioquímicas/morfológicas indican que en 35 días, los órganos de gatos no tratados tienen almacenamiento máximo de glicosaminoglicanos en tejidos (Crawley, *et al.*, J. Clin. Invest. 99:651-662 (1997)). Los niveles de glicosaminoglicano en orina están elevados en el nacimiento en gatos tanto normales como con MPS VI pero tras aproximadamente 40 días, los gatos normales tienen niveles disminuidos. Los glicosaminoglicanos en orina de gatos con MPS VI permanecen elevados o continúan aumentando hasta que alcanzan un estado estacionario tras aproximadamente 5 meses.

Se observa variabilidad en la presentación clínica en miembros de la camada afectados. Además de cierta variabilidad en el momento de aparición de anomalías particulares, el transcurso del tiempo de progresión para algunos de los cambios clínicos y patológicos también es variable. En general, las lesiones óseas normalmente son progresivas (Konde *et al.*, Vet. Radiol. 28:223-228 (1987)), mientras que la opacificación de la córnea no lo es. Además, se ha indicado que algunos gatos paralizados mejoran a paresia grave con el tiempo. Los estudios que detallan la progresión de la enfermedad en gatos individuales se limitan a observaciones clínicas (o radiográficas). Algunos de estos tiene distintas correlaciones patológicas, tales como déficit neurológico y compresión de la médula derivada de la proliferación de tejido óseo en la región toracolumbar (Haskins, et al., J. Am. Vet. Med. Assoc. 182:983-985 (1983)).

Se realizó un estudio de eficacia de seis meses de terapia de sustitución enzimática usando ASB felina recombinante en gatos con MPS VI recién nacidos. Esto fue provocado por la observación de que varios gatos con MPS VI tratados desarrollaron anticuerpos frente a la enzima humana (véase la sección 6.5). Estos anticuerpos pueden alterar la captación y la estabilidad de la enzima (Brooks, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1361:203-216 (1997)). Se administró mediante infusión la enzima felina a 1 mg/kg semanalmente. Las conclusiones principales del estudio eran que se mejoró el GAG en orina, el peso corporal/crecimiento, la morfometría ósea y el aclaramiento de material almacenado de diversos tejidos en relación con la misma dosis de enzima recombinante humana usada en el estudio anterior, que no se detectaron anticuerpos más allá del intervalo observado en gatos normales y que la dosis de enzima felina a 1 mg/kg era comparable en la reversión de la enfermedad a la dosis de enzima humana a 5 mg/kg en una comparación directa (Bielicki, *et al.*, J. Biol. Chem., 274:36335-43 (1999)). Estos estudios indican que es posible una mejora en incremento en los criterios de valoración y en la inmunogenia cuando se administra la enzima derivada de gato a los gatos. Esto proporciona apoyo adicional a la dosificación de pacientes humanos con la enzima humana a 1 mg/kg/semana. Los resultados de este estudio se indican en la tabla 7.

Tabla 8: Eficacia de inyecciones en bolo semanales de ASB felina recombinante derivada de CHO en gatos con MPS VI recién nacidos

	Resultados	
Dosis	1 mg/kg	
Duración	6 meses (n = 2)	3 meses (n = 3)
GAG en orina	Disminuyó hasta 2x los valores normales	Disminuyó hasta 2x los valores normales
Títulos de anticuerpos	• Dentro del intervalo observado en gatos normales	• Ha de completarse
Clínica		
Aspecto	• Opacificación de la córnea persistente • Cierta resolución de dismorfia facial • Forma corporal mejorada	• Opacificación de la córnea persistente • Cierta resolución de dismorfia facial • Forma corporal mejorada
Peso	• Más pesado de lo normal	• Ligeramente más ligero de lo normal
Flexibilidad de la columna vertebral (normal = 180°)	160°-180°	No examinada
Neurológica	• Normal	• Normal
Radiología	• Calidad mejorada • Densidad y dimensiones del hueso (similar a 1 mg/kg de rh4S, ref. 10)	• No examinado
A simple vista		
Grosor de hueso/cartílago	• Variable; disminución del grosor del cartílago • Hueso subcondral más uniforme (similar a 1 mg/kg de rh4S ⁹)	• No examinado
Médula espinal	• No hay compresiones presentes	• No examinado
Nivel celular		
Hígado (Kupffer)	• Aclaramiento del almacenamiento lisosómico completo	• Aclaramiento del almacenamiento lisosómico completo
Piel	• Casi reducción completa en almacenamiento	• Reducción leve

Córnea/Cartilago (oreja, articular)	• Sin aclaramiento del almacenamiento lisosómico en comparación con controles con MPS VI no tratados	• Sin aclaramiento del almacenamiento lisosómico
Válvulas cardíacas	• Reducción significativa del almacenamiento lisosómico	• Ha de completarse
Aorta	• Casi reducción completa en	• Reducción leve en
Dosis	1 mg/kg	
Duración	6 meses (n = 2)	3 meses (n = 3)
	almacenamiento lisosómico	almacenamiento lisosómico

La tabla 9 proporciona un resumen de todos los estudio realizados usando ASB humana recombinante en el modelo de gato con MPS VI.

5 Tabla 9: Resultados del estudio de rhASB

N.º de gato	Dosis	Duración (meses)	Vía de administración	GAG en orina	Histopatología
1	0,8 mg/kg/14 d	7-22	Bolo i.v.	Disminuyeron un 50% en comparación con gatos no tratados	• Normalización de vacuolización en el hígado • Reducción significativa en riñones y piel • Sin corrección en córnea y condrocitos • Sin deposición de complejo inmunitario en riñones
	1,5 mg/kg/7d	22-27	Bolo i.v.		
1	0,5 mg/kg/14 d	12-23	Bolo i.v.	Disminuyeron casi hasta valores normales	
	1,4 mg/kg/7d	23-27	Bolo i.v.		
1	0,8 mg/kg/14 d	2-15	Bolo i.v.		
1	0,2 mg/kg/8 d	6	Bolo i.v.	Reducción marginal en comparación con no tratados	N/A
4	1 mg/kg/7 d	5/6	Bolo i.v.	Disminuyeron y se mantuvieron a 3x los valores normales en comparación con no tratados y 10x los valores normales	• Aclaramiento del almacenamiento lisosómico completo en células hepáticas • Sin pruebas de afectación renal o deposición de complejo inmunitario en los glomérulos • Reducción significativa del almacenamiento lisosómico en las válvulas cardíacas • Contenido de almacenamiento en gradiente de la túnica media a la adventicia en la aorta
1		11	Bolo i.v.		• Reducción leve del almacenamiento lisosómico de la piel (cadera, duramadre, riñón) • Sin pruebas de afectación renal o deposición glomerular • Sin cambios significativos en el almacenamiento lisosómico de córnea/cartílago

2	5 mg/kg/7d	5/6	Bolo i.v.	Disminuyeron y se mantuvieron a 2x los valores normales en comparación con no tratados a 10x los valores normales	• Almacenamiento lisosómico completo en el aclaramiento de hígado y piel (cadera, duramadre, riñón) • Sin pruebas de afectación renal o deposición glomerular • Reducción casi completa en el almacenamiento lisosómico en válvulas cardíacas • Banda delgada de células vacuoladas en la túnica media externa
1		11	Bolo i.v.		• Sin pruebas de afectación renal o deposición glomerular • Reducción casi completa en el almacenamiento lisosómico en válvulas cardíacas • Banda delgada de células vacuoladas en la túnica media externa
2	0,5 mg/kg 2x semana	6	Bolo i.v.	Disminuyeron hasta 3x los valores normales	• Aclaramiento lisosómico completo en hígado • Reducción de leve a moderada en la piel • Reducción variable del almacenamiento lisosómico de las válvulas cardíacas • Reducción leve del almacenamiento lisosómico en la aorta
2	1 mg/kg/7d	1	Infusión prolongada (2 h)	Se redujeron tras la primera o segunda infusión hasta por debajo de valores de gatos con MPS VI no tratados	• Reducción del almacenamiento lisosómico en células del retículo endotelial y muy leve en válvula cardíaca y aorta tras infusión
2			Infusión corta (10 min.)		
5	1 mg/kg/7d	6	Infusión prolongada (2 h)		

Ejemplo 3

Distribución y viabilidad

- 5 Se realizó un estudio inicial para documentar la captación y distribución enzimática, y para servir como estudio piloto de posibles criterios de valoración para estudios de eficacia posteriores (Crawley, *et al.*, J. Clin. Invest. 97:1864-1873 (1996)). Se administró ASB humana recombinante mediante inyección en bolo a gatos afectados una vez por semana o una vez cada dos semanas a de 0,5 hasta 1,5 mg/kg. La evaluación de un gato con MPS VI no tratado (gato D) y un gato normal proporcionó los valores a partir de los que se extrajeron las comparaciones. Los datos del
- 10 gato no tratado se apoyaron adicionalmente por la evaluación de la historia de 38 gatos no tratados adicionales. Se llevaron a cabo los estudios de captación y distribución aguda en gatos normales usando una técnica de ensayo inmunitaria que permitió la detección de ASB humana en presencia de enzima de gato normal.
- 15 Las conclusiones principales de estos estudios demostraron captación amplia de enzima con la predominancia esperada de captación de hígado y bazo tal como se observa en otros estudios de sustitución enzimática en modelos animales con MPS. La eficacia de captación dependía de la presencia de cadenas laterales de hidratos de carbono modificadas con manosa-6-fosfato en la enzima. Se determinó que la semivida de la enzima era de 2-4 días. Terapéuticamente, la enzima aclaró el almacenamiento de una variedad de órganos principales y alteró
- 20 moderadamente la densidad ósea. Los defectos en la córnea, la morfología ósea y los defectos del cartílago no se trataron eficazmente en gatos con MPS VI más viejos. En la tabla 10 se resumen los resultados del estudio.

Tabla 10: Sumario: Estudio de distribución/viabilidad en gatos con MPS VI

Parámetro	Hallazgos				
Gato	A		B		C
	MPS VI tratada		MPS VI tratada		MPS VI tratada
Dosis	0,8 mg/kg durante 14 d	1,5 mg/kg durante 7 d	0,5 mg/kg durante 14 d	1,4 mg/kg durante 7 d	0,8 mg/kg durante 14 d
Edad a la dosis (meses)	7*-22	22-27	12*-33	23-27	2*-15
Parámetros de infusión	2-10 ml (PBS) por vía cefálica durante 5-20 minutos				
t _{1/2} plasmática (bolo i.v.)	• 13,7±3,2 min. a 1 mg/kg • 45 min. a 7,5 mg/kg				
	Todos los valores en relación con enzima ASB felina endógena cuatro horas tras la infusión de 1 mg/kg de rhASB en gatos normales • Hígado: 495x • Bazo: 6x • Pulmón: 22,3x • Corazón: 4,3x • Aorta: 4x • Piel: 31x • Cartílago: 0x • Córnea: 0x				
t _{1/2} tisular	2-4 días a 1 mg/kg en la mayoría de los órganos (enzima detectable en la mayoría de tejidos de gato B, pero sólo en hígado de A tras 7 días)				
Neurológico	• La ambulación fluctuó, pero mejoró a dosis más altas		N/A	• Progresión marginal hasta umbral parético al final del estudio	
Opacidad de la córnea	• No cambió con terapia (examen con lámpara de hendidura 3x hacia el final del tratamiento)				
Esqueleto (rayos X) 4 vistas cada 3 meses	• Las lesiones progresaron (sin mejora radiográfica) • Aumentó el volumen óseo/trabecular # en el gato C (recibió tratamiento anterior) • Compresión vertebral en el gato C				
Anafilaxia	• Sin anafilaxia, molestias mínimas con la infusión;				
Respuesta de anticuerpos (títulos de Ig) MPS VI no tratada = 4.000-32.000	1 x 10 ⁹ (plasma pudo inhibir la actividad enzimática <i>in vitro</i>)	64.000		64.000	
GAG en orina (a ~ 400 días)	• Disminuyó un 50% en comparación con gato no tratado	• Disminuyó hasta valores casi normales			
Sulfato de dermatano en orina (~ 400 días)	• Intermedio para los 3 gatos (en relación con control D no tratado y normal)				
Peso corporal	• 2,5-3,0 kg frente a 4-7 kg de normal				
Hígado/Bazo	• Normal a simple vista				
Válvulas cardíacas	• Normales a simple vista				
Cartílago	• Formación y grosor anómalos				
Microscopía (vacuolización)	• Normalización de vacuolización en hígado, • Reducción significativa en riñones y piel, • Sin corrección en córnea y condrocitos				
Deposición de complejo inmunitario en riñones	• Ausente				

Ejemplo 4

Eficacia en gatos con MPS VI tratados desde su nacimiento

Se realizó un estudio de eficacia de dosis variable a largo plazo en gatos con MPS VI empezando en su nacimiento (Crawley, *et al.*, J. Clin. Invest. 99:651-662 (1997)) y se resume en la tabla 10. Se trataron gatos con MPS VI semanalmente con inyecciones en bolo i.v. de 0,2, 1 y 5 mg/kg de rhASB comenzando en su nacimiento. Se trató un total de 9 gatos durante 5, 6 u 11 meses. Además, se incluyeron 12 gatos con MPS VI y 9 gatos normales como controles no tratados. Las conclusiones principales son que la dosis de 0,2 mg/kg no alteró la progresión de la enfermedad en el gato estudiado, y el único beneficio clínico documentado fue una reducción en el almacenamiento en células de Kupffer hepáticas. Los niveles de GAG en orina disminuyeron hasta valores casi normales durante el ensayo en los grupos de dosis más altas. Además de mejoras en los órganos principales, las dosis más altas de terapia desde el nacimiento pudieron impedir o mejorar la deformidad ósea de la columna vertebral y la forma anómala de muchos huesos. Hubo un efecto dependiente de la dosis sobre la mejora en el volumen de mineral óseo vertebral en L-5, grosor trabecular óseo y la densidad de superficie ósea entre las dosis de 1 y 5 mg/kg, aunque ambas fueron equivalentes en la mejora de la tasa de formación ósea a de 5 a 6 meses de ERT (Byers, *et al.*, Bone 21: 425-431 (1997)). La válvula mitral y la aorta dependían de la dosis y era menos completa a 1 mg/kg pero casi completa a 5 mg/kg. No se observó mejora del almacenamiento en cartílago y córnea a cualquier dosis. El estudio sugiere que la dosis de 1 mg/kg/semana es la concentración más baja para observar beneficio clínico significativo. En la tabla 11 se resumen los resultados del estudio.

Tabla 11: Eficacia de inyecciones en bolo semanales de ASB humana recombinante derivada de CHO en gatos con MPS VI recién nacidos (estudio PC-BM102-002)

		Resultados		
Dosis	1 mg/kg		5 mg/kg	
Duración	5/6 meses	11 meses	5/6 meses	11 meses
N	4	1	2	1
Bioquímica				
GAG en orina	• Disminuyeron y se mantuvieron a 3x los valores normales en comparación con no tratados a 10x los valores normales		• Disminuyeron y se mantuvieron a 2x los valores normales en comparación con no tratados a 10x los valores normales	
Clínica				
Aspecto	• Cambios variables; • Opacificación de la córnea persistente determinada mediante lámpara de hendidura		• Cambios variables; • Opacificación de la córnea persistente determinada mediante lámpara de hendidura	
Peso	• Intermedio (sin prescripción frente a normal)		• Intermedio (sin prescripción frente a normal)	
Flexibilidad de la columna vertebral (normal=180) (MPS VI no tratada = 90º)	130-160º	90º	180º	160º
Neurológicos	• 1 de 4 parálisis leves de las extremidades posteriores	• Sin déficit	• Sin déficit	• Sin déficit
Radiología	• Calidad, densidad y dimensiones óseas mejoradas		• Calidad, densidad y dimensiones óseas mejoradas • Posiblemente superior a 1 mg/kg	
A simple vista				
Grosor del hueso/cartílago	• Variabilidad, pero mejorado	• Enfermedad articular degenerativa presente	• Variabilidad, pero mejorado	• Enfermedad articular degenerativa presente
Médula espinal	• 1 de 4 con diversas compresiones leves	• Sin compresiones	• Sin compresiones de médula	
Nivel celular				

Hígado (Kupffer)	• Aclaramiento del almacenamiento lisosómico completo	• Mantenido	• Aclaramiento del almacenamiento lisosómico completo	• Mantenido
Piel (cadera, duramadre, riñones)	• Sin pruebas de afectación renal o deposición de complejo inmunitario glomerular	• Reducción leve en el almacenamiento lisosómico • Sin pruebas de afectación renal o deposición glomerular	• Aclaramiento del almacenamiento lisosómico completo • Sin pruebas de afectación renal o deposición glomerular	• Mantenido • Sin pruebas de afectación renal o deposición glomerular
Córnea/cartilago (oreja, articular)	NA	• Sin cambios significativos en el almacenamiento lisosómico	NA	• Sin cambios significativos en el almacenamiento lisosómico
Válvulas cardíacas	• Reducción significativa (variable) en el almacenamiento lisosómico	• Reducción significativa (variable) en el almacenamiento lisosómico, casi completa	• Reducción casi completa en el almacenamiento lisosómico	
Aorta	• Gradiente de contenido de almacenamiento desde la túnica media hasta la adventicia		• Banda delgada de células vacuoladas en la túnica media externa	

Ejemplo 5**Eficacia de infusiones dos veces por semana de ASB humana recombinante en gatos con MPS VI recién nacidos**

Se realizó un estudio de seis meses en gatos recién nacidos para evaluar una infusión de 0,5 mg/kg administrada dos veces por semana. Además, la enzima usada en este estudio se derivó exclusivamente de la línea celular CSL-4S-342. Las conclusiones principales del estudio incluyen que en comparación con la dosis semanal de 1 mg/kg notificada anteriormente, este estudio produjo mejoras similares en los parámetros físicos, bioquímicos, neurológicos y radiográficos. Las diferencias más notables fueron flexibilidad de la columna vertebral cervical ligeramente empeorada y menor aclaramiento de almacenamiento lisosómico en los tejidos conectivos más densos tales como las válvulas cardíacas y la aorta. En la tabla 12 se resumen los resultados.

Tabla 12: Eficacia de inyecciones en bolo dos veces por semana de ASB humana recombinante derivada de CHO en gatos con MPS VI recién nacidos

Parámetro	Resultados
Dosis	0,5 mg/kg
Duración	2x semana: 6 meses (n=2; gatos 225f, 226m)
GAG en orina	• Disminuyó hasta 3x los valores normales
Títulos de anticuerpos	• Dentro del intervalo observado en gatos normales
Clínica	
Aspecto	• Opacificación de la córnea persistente • Cierta resolución de dismorfia facial • Forma corporal mejorada
Peso	• Intermedio (entre no tratamiento y normal)
Flexibilidad de la columna vertebral (normal = 180°)	90° - 150°
Neurológicos	• Sin parálisis de las extremidades posteriores
Radiología	• Calidad, densidad y dimensiones mejoradas de los huesos (similar a 1 mg/kg de rh4S en ref. 110)
A simple vista	
Grosor de hueso/cartilago	• Variable; disminuyó el grosor del cartilago y hueso subcondral más uniforme (similar a 1 mg/kg de rh4S ^a)

Médula espinal	• Sin compresiones presentes
Nivel celular	
Hígado (Kupffer)	• Aclaramiento lisosómico completo
Piel	• Reducción de leve a moderada en almacenamiento
Córnea/cartílago (oreja, articular)	• Sin aclaramiento de almacenamiento lisosómico en comparación con controles con MPS VI no tratados
Válvulas cardíacas	• Reducción variable en el almacenamiento lisosómico (completo en 225f; sin cambios con respecto a no tratados en 226m)
Aorta	• Reducción leve en almacenamiento lisosómico

Ejemplo 6

Evaluación de la captación y distribución enzimática como función de la tasa de infusión de la enzima en gatos con MPS VI

El objetivo principal de este estudio era comparar la distribución enzimática, el aclaramiento de almacenamiento de GAG tisular y la disminución de niveles de GAG en orina tras infusión en bolo y tras infusión lenta (2 horas) de una dosis de 1 mg/kg idéntica. El fin de la administración lenta se basa en la experiencia de estudios preclínicos y clínicos de α -L-iduronidasa para el tratamiento de MPS I. Además, el estudio proporcionó los primeros datos de que la enzima producida en BioMarin a partir de la línea celular CSL-4S-342 es biológicamente activa y segura. Las conclusiones principales del estudio incluyen que los cuatro gatos (dos por grupo) tratados en este estudio no mostraron reacción adversa aguda frente a la infusión o bien lenta o bien rápida, ni efectos perjudiciales de infusiones de la enzima repetidas. Sin embargo, la infusión en bolo da como resultado captación hepática alta, que no se prefiere. La infusión lenta proporciona una mejor distribución en los tejidos y por tanto es un método preferido para el ensayo clínico.

La distribución tisular de rhASB obtenida en el estudio sugirió que esas infusiones de 2 horas podían aumentar los niveles enzimáticos en otros órganos aparte del hígado, incluyendo un aumento de la actividad en el cerebro. Se observó inmediatamente reducción en GAG en orina tras la primera o la segunda infusión hasta niveles por debajo del intervalo observado en gatos con MPS VI no tratados. Se observó la corrección de almacenamiento lisosómico en células del retículo endotelial y muy leve en algunos fibroblastos (válvula cardíaca) y células del músculo liso (aorta) tras 5 infusiones. No se observó otra respuesta clínica significativa a las infusiones en cualquier grupo, sin embargo esto no era inesperado debido a la corta duración del estudio y debido a que la terapia empezaba tras haberse desarrollado ya cambios patológicos significativos. La infusión prolongada de 2 horas fue segura y se toleró bien en relación con los protocolos más cortos usados en estudios previos. La infusión de 2 horas puede proporcionar mejoras en la distribución enzimática basada en el gato que pudo evaluarse para determinar la distribución tisular enzimática.

Ejemplo 7

Evaluación de seguridad de 6 meses de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante en gatos afectados con MPS VI

Se han iniciado dos estudios de 6 meses en gatos con MPS VI usando la enzima producida mediante el proceso de fabricación según la presente invención. El fin de estos estudios es evaluar la seguridad y la eficacia de infusiones semanales de la dosis clínica humana prevista de rhASB en gatos que padecen MPS VI. El estudio 6 implica crías de gato dosificadas inicialmente a de 3 a 5 meses de edad. El estudio 7 implica crías de gato tratadas desde su nacimiento con infusiones semanales de la dosis clínica humana prevista de rhASB. Se pretende que los estudios tengan acceso a la toxicología potencial. Se observarán gatos para determinar los cambios en su comportamiento durante la infusión de la enzima recombinante para evaluar posibles respuestas inmunitarias. Se monitorizará el suero para determinar el agotamiento de complemento y para determinar la formación de anticuerpo dirigido frente a la enzima recombinante. Se monitorizará la función orgánica general mediante paneles de química clínica completos (función renal y hepática), análisis de orina y hemogramas completos (CBC) con fórmula leucocítica. Se monitorizarán los niveles de glicosaminoglicano en orina semanalmente a unos puntos de tiempo fijos en relación con la infusión de la enzima. Se documentará la evidencia de mejoras clínicas en enfermedad. Estos datos proporcionarán evaluación adicional de eficacia potencial del tratamiento y validarán la actividad y la captación de la enzima *in vivo*. Los estudios se han llevado y se llevarán a cabo de manera consecuente con los principios y las prácticas de los reglamentos de BPL tanto como sea posible.

Los resultados preliminares del primer estudio indican que la administración de rhASB no ha tenido ningún efecto perjudicial sobre ninguno de los animales, manteniéndose generalmente los pesos corporales y las químicas clínicas dentro de los intervalos de referencia. Sin embargo, ambos gatos con títulos de anticuerpos significativamente

elevados desarrollaron signos clínicos anómalos durante las infusiones, sin embargo ambos animales se comportaron normalmente una vez terminaron las infusiones de la enzima y no pareció que padecieran ningún efecto patológico a plazo más largo. Los tiempos de infusión prolongados (4 horas) y el aumento de antihistamínicos de medicación previa han permitido terapia continuada en los gatos sin ningún signo clínico anómalo. La reducción leve en niveles de GAG en orina sugiere cierta eficacia de la terapia en la reducción de glicosaminoglicanos almacenados en los tejidos o la circulación, sin embargo se observaron fluctuaciones en estos niveles a lo largo del tiempo haciendo difícil la interpretación. Ninguno de los 5 gatos han mostrado mejoras clínicas evidentes en respuesta a ERT, pero esto requerirá al menos un tratamiento de 6 meses basándose en estudios previos²³. Se han desarrollado títulos de anticuerpos en cuatro de los cinco gatos, observándose aumentos perceptibles en los títulos tras 2 meses de ERT. Dos de estos gatos han desarrollado títulos significativamente elevados tras 2 ó 3 meses.

Ejemplo 8

Perfil de seguridad para gatos con MPS VI tratados con rhASB

Se ha comenzado un estudio reclutando gatos afectados que se trataron en el plazo de 24 horas tras su nacimiento. Se han tratado cuarenta y un gatos con MPS VI usando rhASB. Se ha restringido la administración de la enzima a gatos normales a de uno a dos gatos para confirmar la seguridad a corto plazo de nuevos lotes antes de la exposición de los animales afectados valiosos a la terapia. En resumen, no ha muerto ningún gato con MPS VI como resultado de la administración de fármaco, aunque han muerto cuatro gatos como resultado de infección viral o una anomalía congénita subyacente. Se produjo enzima para los estudios según los métodos de producción de la presente invención. En la tabla 13 se indican los datos preliminares.

Tabla 13: Resumen del estudio de eficacia en gatos con MPS VI de Hopwood Laboratory

Estudio n.º	N.º de gatos	Dosis/sem. (mg/kg)	Duración del tratamiento (meses)	Mortalidad
1	2	Variable	13-21	Ninguno
	1			
2	1	0,2	5	Ninguno
2	1	0,2	1	Murió: defecto cardíaco congénito
-	2	0,5	3-5	1 murió por parvovirus
2	4	1	3-11	1 murió por parvovirus
	2			
-	1	1	6 (s.c.)	Ninguno
-	4	1	6	Ninguno
2	2	5	3-11	1 murió por parvovirus
	2			
4	2	0,5 (dos veces)	5	Ninguno
-	3	0,5 (dos veces)	5	Ninguno
5	4	1	1	Ninguno
6	5	1	Empezado	Ninguno
7	5	1	Empezado	Ninguno

Ejemplo 8a

Distribución tisular con infusión lenta

Se emprendió un estudio separado para comparar la tasa de captación y distribución tisular de rhASB en gatos con MPS VI jóvenes (<10 semanas de edad al inicio) usando un protocolo de infusión prolongada (dos horas) o corta (10-15 minutos) (ASB-PC-004). Se sedaron siete gatos normales (12-24 meses de edad) y se les implantaron cánulas en la arteria femoral para permitir la toma de muestras sanguíneas. Se administró mediante infusión rhASB a una dosis de 1,0 mg/kg o 7,3 mg/kg en la vena cefálica en un volumen de 7 ml a lo largo de 40 segundos. Se obtuvieron muestras de sangre arterial heparinizada en serie a aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 60 y 120 minutos tras la dosis. Se recogió plasma mediante centrifugación y se congeló hasta el análisis. Tras cuatro horas, se sacrificaron los animales y se recogieron los tejidos, se pesaron y se congelaron hasta el análisis.

En un estudio separado, tres gatos normales (8-66 meses de edad) recibieron una dosis en bolo i.v. de 1,0 mg/kg de rhASB en un volumen de dosis de 7 ml. Se sacrificó un gato en cada punto de tiempo a 2, 4 ó 7 días tras la dosis. Se recogieron los tejidos seleccionados, se pesaron y se congelaron hasta el análisis. Se sacrificó un gato normal adicional, no expuesto a rhASB, para proporcionar niveles de ASB felina en tejidos para comparaciones analíticas.

5 Se realizó una cuantificación de rhASB o ASB felina en plasma y tejidos usando una técnica de ensayo ELISA. Se adsorbió rhASB en muestras frente a un anticuerpo monoclonal anti-rhASB inmovilizado y se adsorbió ASB felina frente a un anticuerpo anti-rhASB policlonal que reacciona de forma cruzada con ASB felina. Entonces se cuantificó la ASB adsorbida usando un sustrato fluorescente.

10 Los análisis de concentración plasmática mostraron que la $t_{1/2}$ de rhASB a la dosis de 1,0 mg/kg era de $13,7 \pm 3,2$ minutos y era ≈ 45 minutos para la dosis de 7,3 mg/kg. La $t_{1/2}$ tisular tras la dosis de 1,0 mg/kg osciló entre 2,4-4,2 días en el hígado, el bazo, el pulmón, el riñón y el corazón. Se observaron niveles bajos, pero detectables, en estos tejidos (excepto en el corazón) hasta siete días tras la dosificación. Cuatro horas tras una dosis de 1,0 mg/kg de ASB, se detectó la mayor parte de la dosis suministrada al hígado en todos los tejidos medidos excepto cartílago y córnea, estando la mayor parte en el hígado. Con la excepción del cerebro y el cerebelo, los niveles fueron de 4 (aorta) a 495 (hígado) veces más altos que los de ASB felina en el gato control no tratado. Las semividas tisulares determinadas en este estudio (2,4-4,2 días a 1,0 mg/kg) apoyan la frecuencia de dosificación clínica semanal.

20 El objetivo principal de este estudio era evaluar los efectos de la tasa de infusión sobre la distribución enzimática, el aclaramiento de almacenamiento de GAG tisular y la disminución de niveles de GAG en orina. A grupos ($n = 2/\text{grupo}$) de gatos con MPS VI de 10 semanas de edad se les administraron infusiones cortas (10-15 minutos) o prolongadas (dos horas) por vía i.v. de rhASB, 1,0 mg/kg, una vez por semana durante cinco semanas. Se sacrificó a los animales dos días tras la última infusión y se recogieron tejidos seleccionados (hígado, bazo, corazón, pulmón, riñones, piel, aorta, cerebro, cerebelo, cartílago, córnea y ganglios linfáticos) para la determinación de la actividad de ASB y para la evaluación histopatológica. Se almacenaron los tejidos congelados hasta el análisis. El estudio empleó el mismo ensayo inmunitario para determinar los niveles de ASB tisular tal como se describió anteriormente (ASB-PC-001). Un gato en el grupo de infusión de dos horas tenía niveles de enzima tisular reducidos en comparación con los otros gatos tratados. Se detectaron altos niveles de enzima alrededor del sitio de cateterización tras la última dosis mientras que se observaron niveles más bajos en la extremidad contralateral. Estos hallazgos sugieren que el catéter se había retirado prematuramente y había contribuido a los bajos niveles tisulares de ASB observados en los tejidos de este animal. La comparación de las actividades enzimáticas en los tres gatos restantes mostró un aumento de la actividad enzimática en el hígado, el pulmón, el riñón, el cerebro y el cerebelo y una reducción de la actividad en los ganglios linfáticos mesentéricos del gato sometido a infusión de dos horas en relación con los animales sometidos a infusión de 10 minutos. No se encontró enzima en la piel, el cartílago y las córneas. Aunque los datos de este estudio son limitados, los descubrimientos de este estudio sugieren que las infusiones de dos horas pueden dar como resultado un aumento de los niveles enzimáticos en los tejidos (aparte del hígado) en relación con infusiones de 10 minutos, indicando que las infusiones prolongadas proporcionan una mejor distribución tisular.

40 Ejemplo 9

Método de fabricación y purificación (proceso de perfusión)

45 En la tabla 14 se proporciona un diagrama de flujo de proceso que compara los procesos de purificación para los procesos de cultivo celular discontinuo alimentado y basado en perfusión. En la tabla 15 se resumen comparaciones del proceso de purificación discontinuo alimentado así como detalles de los cambios específicos implementados para la purificación del material del proceso de perfusión. La tabla 16 representa el método de purificación usado para los cultivos celulares basados en perfusión.

50 Tabla 14: Comparación del proceso de purificación entre los procesos de perfusión y discontinuo

Proceso discontinuo	Proceso de perfusión
Filtración de producto recogido	Filtración de producto recogido
↓	↓
Concentración 10x y diafiltración	Concentración 20x
↓	↓
Cromatografía DEAE-Sepharose	Ajuste del pH y filtración
↓	↓
Cromatografía Blue SepharoseFF	Cromatografía Blue SepharoseFF
↓	↓

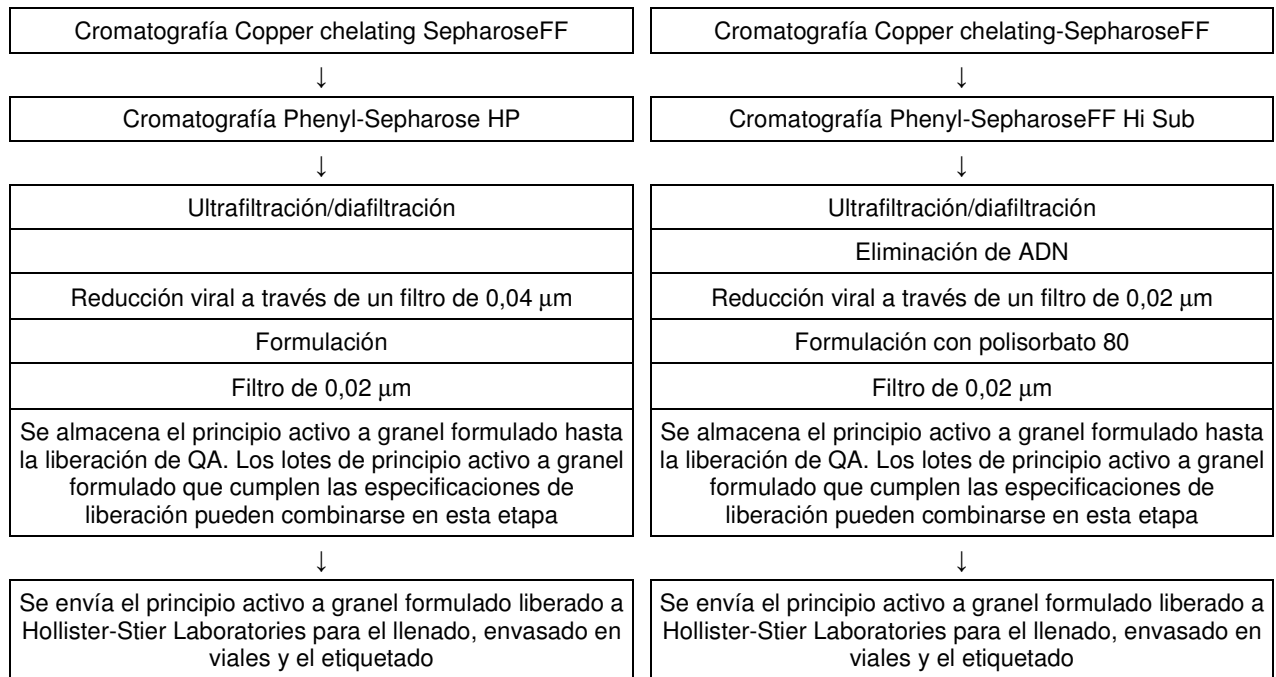


Tabla 15: Descripción resumen de los cambios de la purificación

Etapa de producción	Descripción (discontinuo)	Descripción (perfusión)
PROCESO DE PURIFICACIÓN		
Concentración/ Diafiltración	Filtración de flujo tangencial: 2,8 m ² Filtros de MWCO de retención de albúmina Operación: • Concentración hasta 10X • Se diafiltró frente a 5 volúmenes de fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,3	Cambios: Filtración de flujo tangencial: 5,6 m ² Filtros de MWCO de retención de albúmina Operación: • Concentración hasta 20X • Sin diafiltración, se aclaró el sistema con fosfato de sodio 100 mM, pH 7,3 Fundamento: • Reducción de volumen para el almacenamiento a 4°C
↓		
Cromatografía de flujo a través DEAE-Sepharose FF	Columna: 2 x 30 cm de diámetro x 33 cm de altura • Prelavado: hidróxido de sodio 0,1 N • Lavado: Agua para inyección (WFI) • Neutralizar: fosfato de sodio 100 mM, pH 7,3 • Equilibrado: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,3 • Carga: producto recogido concentrado / diafiltrado • Lavado: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,3 • Separación: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,5 M, pH 7,3 • Regeneración: ácido acético glacial al 10% • Lavado: Agua para inyección (WFI) • Desinfección: hidróxido de sodio 0,5 N • Almacenamiento: hidróxido de sodio 0,1 N	Etapa eliminada
↓		

Ajuste de pH y filtración		• Ajuste del pH: adición de ácido acético glacial al 10% a concentrados 20X combinados hasta un pH final de 5,0 • Carga: concentrados 20X combinados • Filtración a través de filtros de clarificación y filtro de 0,2 µm • Purgado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 120 mM, pH 5,0 Fundamento: • Aumenta la capacidad de unión a rhASB de la columna de resina de Blue Sepharose posterior
Cromatografía Blue Sepharose FF	Columna: 20 cm de diámetro x 11 cm de altura • Prelavado: hidróxido de sodio 0,1 N • Lavado: Agua para inyección (WFI) • Neutralización: acetato de sodio 1 M, pH 5,5 • Equilibrado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,5 • Carga: flujo a través de DEAE ajustado para acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,5 • Lavado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,5 • Elución: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,5 • Regeneración: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 5,5 • Desinfección: hidróxido de sodio 0,1 N • Lavado 1: Agua para inyección • Lavado 2: acetato de sodio 1 M, pH 5,5 • Almacenamiento: etanol al 20%	Cambio Columna: 45 cm de diámetro x 16 cm de altura Neutralización: omitida • Equilibrado: fosfato de sodio 10 mM pH 6,45 • Carga: concentrados 20X combinados, pH ajustado a 5,0 y filtrado. • Lavado: fosfato de sodio 10 mM, pH 6,45 • Elución: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 6,45 • Regeneración: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 6,45 • Lavado 2: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 6,45 Fundamento: • Las condiciones permiten la una mejora de la eliminación de impurezas de CHO potenciales lo que permite la eliminación de cromatografía DEAE Sepharose.
↓		
Cromatografía Copper Chelating Sepharose FF	Columna: 14 cm de diámetro x 9 cm de altura Prelavado: hidróxido de sodio 0,1 N • Lavado: Agua para inyección (WFI) • Tampón de carga: sulfato cúprico 0,1 M • Equilibrado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 6,0 • Carga: Ajustar el contenido en glicerol de eluato de Blue hasta el 10%, añadiendo acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, glicerol al 50%, pH 6,0 • Lavado 1: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 6,0 • Lavado 2: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 4,0 • Lavado 3: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,8 • Elución: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,6 • Regeneración: EDTA 50 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 8,0 • Desinfección: hidróxido de sodio 0,5 M • Almacenamiento: hidróxido de sodio 0,1 M	Cambios: Columna: 40 cm de diámetro x 16 cm de altura • Equilibrado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 5,5 • Carga: Ajustar el contenido en glicerol de eluato de Blue combinado hasta el 10%, añadiendo acetato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 2,0 M, glicerol al 50%, pH 5,2 • Lavado 1: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 5,5 • Lavado 2: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,9 • Lavado 3: omitido Fundamento: • Pureza del producto constante y reproducible obtenida con la etapa modificada
↓		

Inactivación viral	Se mantienen las fracciones de eluato combinadas durante 30-120 minutos antes del ajuste a pH 4,5 con NaOH 0,5 M	Sin cambios
↓		
Cromatografía de Phenyl Sepharose	Columna: 10 cm de diámetro x 16 cm de altura Resina: Phenyl Sepharose High Performance • Prelavado: hidróxido de sodio 0,1 N • Lavado: Agua para inyección (WFI) • Equilibrado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 3,0 M, pH 4,5 • Carga: Ajustar el contenido en cloruro de sodio de eluato de Copper hasta 3 M, añadiendo acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 5 M, pH 4,5 • Lavado 1: acetato de sodio 20 mM, 3,0 M cloruro de sodio, pH 4,5 • Lavado 2: acetato de sodio 20 mM, 1,6 M cloruro de sodio, pH 4,5 • Elución: acetato de sodio 20 mM, 1 M cloruro de sodio, pH 4,5 • Regeneración: acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 • Desinfección: hidróxido de sodio 0,5 N • Almacenamiento: hidróxido de sodio 0,1 N	Cambio Columna: 40 cm de diámetro x 16 cm de altura Resina: Phenyl Sepharose High Sub Fast Flow • Equilibrado: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 4,5 • Carga: Ajustar el contenido en cloruro de sodio de eluato de Copper hasta 2 M, añadiendo acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 5 M, pH 4,5 • Lavado 1: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 7,1 • Lavado 2: acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 4,5 • Elución: acetato de sodio 20 mM, 250 mM cloruro de sodio, pH 4,5 Fundamento: • La resina alternativa tiene características de flujo y capacidad más favorables para rhASB • El lavado 1 permite un aclaramiento robusto de impurezas de proteína potenciales
↓		
UF/DF final	Filtración de flujo tangencial con filtros de MWCO de 10 kDa < 0,4 m². • Equilibrado: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8 • Concentración: Concentración hasta NMT 1,5 mg/ml • Diafiltración: fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8	Cambio Filtración de flujo tangencial: filtros de MWCO de 10 kDa de 2,8 m².
↓		
Eliminación de ADN	No se hace	Nueva etapa: • Filtración de ADN: Se filtró el producto a través de un filtro de ADN basado en intercambio iónico. Fundamento: • Aclaramiento de ADN adicional para compensar la delección de la etapa de cromatografía de flujo a través de DEAE.
↓		
Formulación	• Se diluye hasta 1,0 mg/ml con fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8	
↓		
Filtración viral	• Filtración viral: Se filtra el producto a través de un filtro de 0,04 µm	Cambio: • Filtración viral: Se filtra el producto a través de un filtro de 0,02 µm Fundamento: • Uso de tamaño de poro más pequeño para potenciar el aclaramiento viral.
↓		

Formulación	La etapa se realiza antes en el proceso (antes de la filtración viral)	Cambio: • Se diluye hasta 1,0 mg/ml con fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8 • Formulación: Se añade polisorbato 80 hasta una concentración de 50 µg/ml.
↓		
Filtración	• Filtración: Filtrar el producto diluido a través de un filtro de 0,2 µm en un recipiente de almacenamiento	Sin cambios

Tabla 16: Método de purificación de rhASB (Proceso de perfusión)

Etapa	Proceso
Filtración de producto recogido	Filtración a través de filtros de clarificación, filtros de 0,45 µm y finalmente filtro de 0,2 µm. Los productos recogidos combinados filtrados se almacenan en bolsas de polipropileno
Concentración por UF	Equilibrado y purgado: Fosfato de sodio 100 mM, pH 7,3 Carga: Fluido recogido filtrado Concentración: Concentración hasta 20X Filtración: Filtrar el producto diluido a través de un filtro de 0,2 µm en un recipiente de almacenamiento
Ajuste del pH y filtración	Ajuste del pH: Añadir ácido acético glacial al 10% a concentrados 20X combinados hasta un pH final de 5,0 Carga: Concentrados 20X combinados Aclarado: Agua para inyección (WFI) Filtración a través de filtros de clarificación y filtro de 0,2 µm. Purgado: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 120 mM, pH 5,0
Blue Sepharose 6 FF (Blue, Blue Sepharose)	Prelavado: Hidróxido de sodio 0,1 N Lavado: Agua para inyección (WFI) Equilibrado: Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,45 Carga: Concentrados 20X combinados, filtrados y con pH ajustado Lavado: Fosfato de sodio 10 mM, pH 6,45 Elución: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 6,45 Regeneración: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 6,45 Desinfección: Hidróxido de sodio 0,1 N Lavado 1: Agua para inyección (WFI) Lavado 2: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 6,45 Almacenamiento: Etanol al 20%
Chelating Sepharose FF (Copper, CC, Copper Chelating)	Prelavado: Hidróxido de sodio 0,1 N Lavado: Agua para inyección (WFI) Tampón de carga: Sulfato cúprico 0,1 M Equilibrado: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 5,5 Carga: Ajustar el contenido en glicerol de los eluatos de Blue combinados hasta el 10%, añadiendo acetato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 2,0 M, glicerol al 50%, pH 5,2 Lavado 1: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 5,5 Lavado 2: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,9 Elución: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, glicerol al 10%, pH 3,6 Eluato mantenido durante 30-120 minutos antes del ajuste a pH 4,5 con NaOH 0,5 M Regeneración: EDTA 50 mM, cloruro de sodio 1,0 M, pH 8,0 Desinfección: Hidróxido de sodio 0,5 M Almacenamiento: Hidróxido de sodio 0,1 M

Phenyl Sepharose 6 FF High Sub (Phenyl, Phenyl High Sub)	Prelavado: Hidróxido de sodio 0,1 N Lavado: Agua para inyección (WFI) Equilibrado: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 4,5 Carga: Ajustar el contenido de cloruro de sodio del eluato de Copper hasta 2 M, añadiendo acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 5 M, pH 4,5 Lavado 1: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 7,1 Lavado 2: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 2,0 M, pH 4,5 Elución: Acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 4,5 Regeneración: Acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 Desinfección: Hidróxido de sodio 0,5 N Almacenamiento: Hidróxido de sodio 0,1 N
UF/DF, filtración de ADN, filtración viral, formulación	Equilibrado: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8 Concentración: Concentración hasta NMT 1,5 mg/ml Diafiltración: Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8 Filtración de ADN: Producto filtrado a través de un filtro de ADN Filtración/dilución viral: producto filtrado a través de un filtro de 0,02 µm y diluido hasta 1,0 mg/ml Formulación: Se añade polisorbato 80 a una concentración de 50 µg/ml Filtración: filtrar el producto diluido a través de un filtro de 0,2 µm en un recipiente de almacenamiento

Se regeneran todas las columnas de purificación antes de su uso, se desinfectan tras su uso y se almacenan en los tampones apropiados tal como se indica en las tablas 15 y 16.

5 Materiales de partida de purificación

Todos los materiales se suministran por proveedores cualificados.

Tabla 17: Materiales de partida para purificación

Componente	Calidad
Ácido acético glacial	USP
Sulfato cúprico pentahidratado	USP
Edetato de disodio	USP
Alcohol deshidratado, USF (Etanol, 200 Proof)	USP
Glicerina	USP
Acetato de sodio, trihidratado	USP
Cloruro de sodio	USP
Disolución de hidróxido de sodio al 50% p/p	Calidad de reactivo
Fosfato de sodio, dibásico, heptahidratado	USP/EP
Fosfato de sodio, monobásico, monohidratado	USP
Ácido clorhídrico, disolución volumétrica 6 N	Calidad de reactivo
Polisorbato 80 MF/EP (CRILLE 4 HP)	NF/EP
Agua para inyección, envasada a granel	USP

10 La glicerina que va a utilizarse se deriva de un proceso sintético. Todos los materiales de partida usados deben cumplir con la última versión de la nota de orientación del CPMP/CVMP titulada, "Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents Via Human and Veterinary Medicinal Products", en la que los derivados de sebo tales como glicerol y ácidos grasos preparados mediante procesos rigurosos que implican condiciones de

15 altas temperaturas y presión o reacciones químicas que se sabe que son letalmente hostiles para el agente de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) se cree que es poco probable que sean infecciosos. Por tanto, se considera que el riesgo de transmisión de EEB de la glicerina es bajo.

20 La seguridad viral de rhASB se confirma mediante una combinación de selección y cualificación de los proveedores, pruebas del material de partida, estudios de caracterización del banco de células, estudios de eliminación viral y capacidad de inactivación de los procesos de purificación de rhASB y pruebas de liberación de lote de rutina. Se ha hecho referencia a reglamentos y directrices de los EE.UU., UE e ICH para garantizar la seguridad viral de rhASB.

Cromatografía en columna, eliminación de ADN y filtración viral

Ahora se purifica rhASB usando una serie de etapas de cromatografía y filtración. Se concentra el fluido recogido hasta 20X mediante ultrafiltración, se ajusta el pH, se filtra y se carga en una columna de cromatografía Blue Sepharose Fast Flow (45 cm x 16 cm). Se filtra el eluato de Blue Sepharose Fast Flow antes de cargarlo en una columna Copper Chelating Sepharose. Se filtra el eluato de Copper antes de cargarlo en una columna Phenyl Sepharose Fast Flow High Sub. Las tres etapas de purificación por cromatografía en columna se llevan a cabo en un modo de unión y elución. Se hace pasar el eluato de la columna Phenyl Sepharose a través de un filtro de intercambio aniónico y un filtro de reducción viral antes de la concentración e intercambio de tampón mediante ultrafiltración.

Estudios de eliminación/inactivación viral

Se llevaron a cabo dos estudios para evaluar la capacidad de reducción viral del proceso de purificación de rhASB modificado. Se realizaron estudios en BioReliance (Rockville, MD) usando dos sistemas de virus de modelo, virus de leucemia murino xenotrópico (XMuLV) y virus diminuto murino (MMV). XMuLV es un retrovirus de ARN monocatenario con envuelta con baja resistencia a la inactivación fisicoquímica. MMV es un virus de ADN monocatenario, sin envuelta, pequeño, con alta resistencia a los agente fisicoquímicos.

Estos estudios evaluaron dos etapas cromatográficas (Copper Chelating Sepharose FF y Phenyl Sepharose FF High Sub) y el filtro viral (0,02 µm) usados en el proceso de purificación de rhASB. Se realizaron estudios de adiciones conocidas y de recuperación usando versiones a escala reducida de las etapas del proceso. Los parámetros críticos mantenidos fueron los tiempos de retención y las interacciones matriz-disolución. Esto se logró replicando los tampones, las velocidades de flujo lineal y las alturas de columna pero ajustando el diámetro de columna. Se recogieron los materiales usados en el estudio (producto y tampones) de la producción a escala completa real.

Se acondicionaron las columnas de cromatografía (Copper Chelating Sepharose y Phenyl Sepharose) y se ejecutaron previamente o bien con cargas de rhASB típico (blanco) o bien con cargas con adiciones conocidas de tampón viral antes del envío a BioReliance. Los cromatogramas y los rendimientos de producto en presencia de tampones virales eran comparables a ejecuciones de blanco. Se realizaron adiciones conocidas en cargas de columna idénticas o bien de XMuLV o bien de MMV inmediatamente antes de la cromatografía. Se determinó la cantidad de reducción viral para cada una de las etapas evaluadas comparando la carga viral en las cargas de columna y los eluatos. En la tabla 18 se muestra un resumen de los resultados de este estudio.

Tabla 18: Factores de reducción para XmuLV y MMV

Etapas del proceso	Reducción logarítmica de XMuLV	Reducción logarítmica de MMV
Blue Sepharose	No sometido a prueba	No sometido a prueba
Copper Chelating (+mantenimiento de pH bajo)	$\geq 3,5 \pm 0,52$	$\pm 2,71 \pm 0,52$
Phenyl Sepharose	$\geq 3,54 \pm 0,36$	$\geq 1,72 \pm 0,64$
Filtración de ADN	No sometido a prueba	No sometido a prueba
Filtración viral	$\geq 5,51 \pm 0,43$	$\geq 4,76 \pm 0,00$
Reducción logarítmica total	$\geq 12,56$	$\geq 9,19$

Pruebas en proceso

Se realizan pruebas en proceso a lo largo de todo el proceso y se ilustran en la figura 3. En las tablas 19 y 20 se describen pruebas en proceso del fluido de cultivo celular recogido y de los productos intermedios de purificación.

Tabla 19: Pruebas en proceso del fluido de cultivo celular recogido

Prueba	Niveles de acción
Endotoxina bacteriana mediante LAL (USP/EP)	≥ 2 UE/ml
Carga biológica(USP/EP)	≥ 1 ufc/10 ml
Proteínas totales mediante Bradford y actividad	Resultados usados para el cálculo de la carga de columna Blue Sepharose
Micoplasma ¹	Negativo (especificación de liberación)

Ensayo <i>in vitro</i> para determinar la presencia de contaminantes virales ¹	Negativo (especificación de liberación)
---	---

¹ Se realiza la toma de muestras en múltiples puntos de tiempo durante la fase de recogida de cultivo celular de la fabricación. Se somete a prueba la última muestra retirada antes de la germinación del proceso de cultivo celular y se requiere un resultado negativo para la liberación del lote.

5 Tabla 20: Pruebas en proceso de los productos intermedios de purificación

Prueba	Niveles de acción
Endotoxina bacteriana mediante LAL (USP/EP)	≥ 3 UE/ml en eluatos de columna ¹
Carga biológica(USP/EP)	≥ 20 ufc/ml de filtración previa ¹
	≥ 1 ufc/100 ml en el principio activo a granel formulado (FBDS) ²
Actividad	Resultado usado para el cálculo de las cargas de columna de Copper Chelating y Phenyl Sepharose
Proteínas totales mediante espectrofotometría UV-Vis	Resultado usado para el cálculo de la concentración de proteínas para la UF/DF

¹ Los resultados que superan los niveles de acción se investigan mediante procedimientos normalizados de trabajo.

² Si los resultados superan el nivel de acción, el FBDS se filtrará a través de un filtro de 0,2 μ m en recipientes de almacenamiento estériles apropiados y después se pondrán en cuarentena a la espera de la liberación para el envío a los sitios de llenado.

10

Resultados del método de perfusión de purificación de la rhASB precursora

La tabla 21 proporciona datos sobre el grado de pureza de rhASB obtenida usando los métodos de purificación descritos en las tablas 15 y 16. La columna de "pureza mediante RP-HPLC" indica el grado de pureza obtenido para la cantidad combinada de las formas tanto precursora como madura de rhASB.

15

Tabla 21: Resultados de liberación de lote de rhASB

Lote	Pureza mediante RP-HPLC	Presencia de las formas procesadas*	Proceso de fabricación
A60028	99,6	-	Proceso discontinuo
AP60029	98,8	+	Proceso discontinuo
A60030	98,7	+	Proceso discontinuo
AP60031	99,1	-	Proceso discontinuo
AP60032	99,8	-	Proceso discontinuo
AP60033	99,4	-	Proceso discontinuo
AP60035	99,7	-	Proceso discontinuo
AP60036	99,4	-	Proceso discontinuo
AP60038	99,6	-	Proceso discontinuo
AP60039	99,3	-	Proceso discontinuo
AP60040	99,1	-	Proceso discontinuo
AP60101	99,3	-	Proceso discontinuo
AP60102	98,9	-	Proceso discontinuo
AP60103	99,0	-	Proceso discontinuo
AP60104	99,0	+	Proceso discontinuo
AP60105	99,0	-	Proceso discontinuo
AP60106	99,2	-	Proceso discontinuo
AP60107	99,4	-	Proceso discontinuo
AP60108	99,7	-	Proceso de perfusión
AP60109	99,8	-	Proceso de perfusión

AP60201	99,0	N/A	Proceso de perfusión
AP60202	100	-	Proceso de perfusión

* “+” indica la presencia de las formas procesadas (estimadas al 1+15%) en el principio activo a granel formulado; “-” indica la ausencia de formas procesadas.

5 Las figuras 4A-4C proporcionan los cromatogramas representativos de las tres etapas cromatográficas del método de purificación por perfusión (tabla 16). La tabla 22 proporciona las recuperaciones promedio de rhASB precursora para cada una de estas tres etapas cromatográficas. La figura 5 proporciona los datos para el análisis de la pureza de muestras en el proceso en cada etapa cromatográfica y del producto final purificado (rhASB precursora).

Tabla 22: Resumen de recuperaciones de purificación

Etapas	Recuperación promedio (%)
Ajuste del pH a 5,0	83
Columna Blue Sepharose	84
Columna Copper Chelating Sepharose	86
Transición de cobre a fenilo	86
Columna Phenyl Sepharose	88
Global	50

10 Cuando se comparan productos purificados obtenidos usando el proceso discontinuo y el proceso de perfusión, el proceso de perfusión produce claramente una rhASB precursora más pura. Incluso intentos por optimizar adicionalmente los procesos discontinuos seleccionando diferentes fracciones de lavado o variando las condiciones no dieron como resultado el producto puro de manera constante obtenible mediante el proceso de perfusión. El

15 proceso de perfusión puede producir una pureza de rhASB precursora constante del 99% o más, mientras que el proceso discontinuo no (tabla 21). La figura 6 proporciona una comparación entre los productos obtenidos usando el método discontinuo antiguo en el que el cultivo celular se cultiva usando un medio que se complementa con G418 y no se complementa con ácido fólico, serina y asparagina (carril 2), y los productos purificados que se han purificado usando el proceso de perfusión (carriles 3-9)). Se desnaturalizaron las muestras de rhASB en SDS con un agente

20 reductor y se sometieron a electroforesis a través de PAGE al 4-20% en tampón de transferencia de SDS. Los productos purificados mediante el proceso discontinuo contienen claramente muchas más impurezas (especialmente cerca del tamaño de 48 kDa) que los productos purificados mediante el proceso de perfusión. La rhASB del proceso discontinuo aparece en cantidades detectables de formas procesadas (estimadas al 1-15%) (carril 2). Los lotes purificados mediante el proceso de perfusión son altamente comparables entre sí y son significativamente menos

25 complejos que el patrón de rhASB purificada mediante el proceso discontinuo, lo que indica un grado de pureza superior para el material del proceso de perfusión.

La tabla 23 proporciona el porcentaje de pureza de rhASB precursora purificada usando el método de purificación mediante el proceso de perfusión.

30 Tabla 23: Pureza del producto final

Lote	Pureza mediante RP-HPLC (% del pico principal)
AC60109 UF n.º 4	99,8
AC60109 UF n.º 10	99,6
AC60109 UF n.º 1	99,7
AC60109 UF n.º 18	99,9
AC60109A UF n.º 22	99,7
AC60109A UF n.º 25	99,8
AC60109A UF n.º 27	100
Fabricación de AC60109 BMK	99,8
AC60202 UF n.º 4	ND
AC60202 UF n.º 10	ND
AC60202 UF n.º 18	ND

Fabricación de AC60202 BMK	100
Promedio	99,8

ND = no determinado.

La tabla 24 proporciona el porcentaje de pureza de lotes de rhASB precursora purificada usando el método de purificación mediante el proceso de perfusión, en el que se ha evaluado la pureza mediante RP-HPLC y SEC-HPLC (que permite la cuantificación de impurezas de diferentes pesos moleculares tales como formas procesadas o multímeros).

Tabla 24: Pureza mediante RP-HPLC y SEC-HPLC

Lote	Pureza mediante RP-HPLC (% del pico principal)	Pureza mediante SEC-HPLC (% del pico principal)
AP60109	99,8	99,8
AP60202	100	>99
AP60204	99,7	99,8
AP60206	100	99,8
AP60301	100	99,6
AP60302	100	99,6
AP60303	100	99,5
AP60304	100	ND*
Promedio	99,9	99,6

* No determinado

Eliminación de proteasas en el proceso de perfusión

A la escala discontinua de 180 l, se requieren dos series en DEAE Sepharose de 24 l relativamente grandes. El proceso de perfusión genera volúmenes de tampón para lograr una purificación a gran escala práctica y volúmenes de recogida 10 veces más grandes que imponen tamaños de columna de DEAE Sepharose poco prácticos estrictos 10 veces mayores. Por tanto, se evaluó la eliminación de la etapa de DEAE Sepharose particularmente insostenible en un esfuerzo por hacer más eficaz la nueva serie de purificación por perfusión. Como consecuencia, la serie tres columnas (tal como se describe en la tabla 16) supera este obstáculo para la producción a gran escala.

Se empleó principalmente la etapa de cromatografía en DEAE Sepharose en el proceso discontinuo (descrito en la tabla 15) para eliminar la proteína total (incluyendo proteasas) y el colorante indicador de pH, rojo fenol. Se aborda este último problema en el nuevo proceso mediante la eliminación de rojo fenol de la formulación de medio 302. La eliminación de la proteína total mediante la etapa de DEAE Sepharose dio como resultado una capacidad superior de Blue Sepharose a pH 5,5. En el nuevo proceso, necesitaban identificarse las condiciones de Blue Sepharose que equilibraban una alta capacidad de rhASB al mismo tiempo que se limitaba la actividad proteasa. Tanto la capacidad como la proteólisis se potencian a pH bajo. Además, debe demostrarse que el aclaramiento de proteasas mejora la robustez de la etapa de cromatografía de cobre posterior, en la que se ha encontrado que el aclaramiento de la proteasa catepsina es problemático en el proceso discontinuo. Se encontraron condiciones que producían los resultados deseados, por lo cual, se realizó la carga a pH bajo, mientras que las condiciones de lavado y elución eran a pH superior, condiciones que aclaran eficazmente la proteasa catepsina, con una carga aceptable de 0,8 mg de rhASB/ml de resina. La eliminación de la actividad proteasa (por ejemplo catepsina) se demuestra en los cromatogramas de la figura 8.

La comparación de rhASB purificada a partir de la serie de perfusión 102PD0055 usando o bien el nuevo proceso (sin cromatografía de DEAE FT) o bien el proceso de purificación discontinuo antiguo (eluato de PS (OP) indica que el material del proceso antiguo purificado (usando el método discontinuo) de la misma serie de reactor, carril de eluato de PS (OP), tiene significativamente más proteólisis, tal como se demuestra por las bandas adicionales en gel teñido con plata y detectables mediante anticuerpos anti-ASB (véase la figura 9). El nuevo proceso es mucho más puro en relación con el patrón discontinuo. La proteasa catepsina se clarifica mediante cromatografía Blue. Se observa material de reacción cruzada anti-catepsina en la fracción de separación de Blue usando el nuevo proceso.

Los resultados farmacocinéticos descritos a continuación en el ejemplo 11 muestran que la preparación de rhASB más pura da como resultado una semivida más larga que el patrón discontinuo previo.

Ejemplo 10

Efectos del tensioactivo sobre la formación de partículas

Se llevó a cabo un protocolo experimental para determinar el efecto de polisorbato-80 sobre la generación de partículas en viales de rhASB preparada con el nuevo proceso de cultivo celular de perfusión. Se emplearon ensayos de recuento de partículas y visuales para determinar el grado de generación de partículas. Además, se realizaron pruebas de actividad, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), inmunotransferencia y cromatografía de exclusión molecular (SEC) para confirmar la calidad del producto en presencia de polisorbato-80 y/o agitación en relación con controles no tratados. También se compararon los viales y tapones usados para el proceso discontinuo de rhASB (antiguos, Wheaton 5 ml, 2905-B24B/West S-127 (4401/45)) con los viales y tapones propuestos para su uso para el material derivado de perfusión (nuevos, Wheaton 5 ml, 2905-B8BA/West S-127 (4432/50)).

Se llenaron los viales tras haberse hecho pasar rhASB a través de un filtro de 0,2 µm usando una pipeta desechable de 10 ml. Se llenaron dos viales para cada prueba que contenía rhASB. Se usaron ambos para el ensayo visual dedicándose uno al recuento de partículas y guardándose el otro para el resto de los ensayos. Sólo se llenó un vial control de tampón/prueba. Se introdujeron pocas partículas debido al sistema, la manipulación de la muestra, filtración o llenado. A partir del análisis de recuento de partículas y visual (resultados mostrados en las tablas 25A-C y 26A-C a continuación), en los días 0, 1 y 14, no se detectó formación de material particulado significativa en viales no agitados de fármaco formulado en relación con controles de sólo tampón.

Tras 18 h de agitación a 4°C; se observó un gran aumento en las partículas en ambas configuraciones de viales con rhASB en tampón de solo (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,8), sin polisorbato. Eran claramente visibles copos finos.

Se realizó el recuento de partículas usando el contador de partículas HIAC/ROYCO modelo 9703. El contador de partículas líquidas puede determinar el tamaño y contar partículas que oscilan entre 2,0 µm y 150 µm. Se ponen tres alícuotas de no menos de 5 ml cada una en el sensor de oscurecimiento de luz. Se notifican los recuentos de partículas promedio de las series 2 y 3 como recuentos de partículas por ml. Basándose en la cuantificación por HIAC-Royko de partículas de 10 µm de tamaño, se contaron 2069 y 1190 partículas/ml en configuraciones de viales antiguos y nuevos, respectivamente. En presencia de polisorbato-80 al 0,001%, se encontró un recuento marcadamente inferior con 21 y 49 partículas/ml. A polisorbato-80 al 0,005%, no pudieron detectarse esencialmente diferencias entre viales agitados y no agitados.

En sellos/viales antiguos sin polisorbato-80, hubo una disminución inesperada en los recuentos de partículas/ml de desde 2069 hasta 268 desde los días 1 hasta 14 tras la agitación. El ensayo visual indicó copos más grandes en los mismos viales de 14 días en los que se encontraron recuentos inferiores; es posible que las partículas más grandes interfirieran con el ensayo de HIAC-Royko, o que la configuración de viales antiguos contribuyese a un aumento de la formación de partículas con coalescencia y agregación finales en partículas más grandes, aunque en menor número.

Se realizaron pruebas adicionales para confirmar la integridad de la proteína tras la agitación. La actividad específica no cambió. La cromatografía de exclusión molecular, un método que puede detectar cambios en la agregación de proteínas, que podría verse influida por la agitación mecánica, no mostró ningún aumento en especies de peso molecular más grande. Con el fin de detectar productos de descomposición, los geles de SDS-PAGE de rhASB o bien se tiñeron con plata o bien se transfirieron sobre nitrocelulosa y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-rhASB. No se detectaron bandas adicionales en ninguna de las muestras.

Tabla 25A: Ensayo visual. Día 0

		102D0089-01		Tampón
Vial	[Polisorbato-80] %	Sin agitación		Sin agitación
Antiguo	0	(-)	(-)	(-)
Antiguo	0,005	(-)	(-)	(-)
Antiguo	0,001	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0,005	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0,001	(-)	(-)	(-)

50 Tabla 25B. Ensayo visual. Día 1

		102D0089-08	Tampón
--	--	-------------	--------

Vial	[Polisorbato-80] %	Agitación		Sin agitación		Agitación	Sin agitación
Antiguo	0	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
Antiguo	0,005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Antiguo	0,001	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0	(++)	(++)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0,005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0,001	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

Tabla 25C. Ensayo visual. Día 14

		102PD0089-01				Tampón	
Vial	[Polisorbato-80] %	Agitación		Sin agitación		Agitación	Sin agitación
Antiguo	0	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)
Antiguo	0,005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Antiguo	0,001	(+/-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0	(++)	(++)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0,005	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nuevo	0,001	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

Ensayo visual:

Sin precipitación visible –

5 Caso límite, no se está seguro sobre la observación +/-

Pequeña cantidad de precipitado fino +

Precipitación significativa, turbio ++

Muy turbio, grandes copos de precipitado +++

10 Tabla 26A. Análisis particulado, HIAC-Royko (partículas/ml). Día 0

		102PD0089-01		Tampón	
Vial	[Polisorbato-80] %	Sin agitación		Sin agitación	
		10 µm	25 µm	10 µm	25 µm
Antiguo	0	4,5	0,5	2,5	0,0
Antiguo	0,005	2,0	0,5	1,5	0,0
Antiguo	0,001	4,5	1,5	2,5	1,0
Nuevo	0	6,5	2,5	6,0	4,0
Nuevo	0,005	1,5	0,5	3,0	1,0
Nuevo	0,001	19,5	5,0	2,0	0,0

Tabla 26B. Análisis particulado, HIAC-Royko (partículas/ml). Día 1

		102PD0089-01				Tampón			
Vial	[Polisorbato-80]%	Agitación		Sin agitación		Agitación		Sin agitación	
		10 µm	25 µm	10 µm	25 µm	10 µm	25 µm	10 µm	25 µm
Antiguo	0	2069,0	74,5	3,0	0,5	0,5	0,5	2,5	2,0
Antiguo	0,005	3,5	0,0	2,0	0,5	3,5	2,5	1,0	0,5
Antiguo	0,001	21,5	2,5	2,0	1,0	2,5	1,0	1,5	1,5
Nuevo	0	1190,0	34,5	5,0	0,5	0,0	0,5	2,5	3,5
Nuevo	0,005	19,0	0,0	4,5	0,0	2,5	0,0	17,0	0,0
Nuevo	0,001	49,0	0,5	9,0	2,5	9,5	0,5	6,0	1,0

Tabla 26C. Análisis particulado, HIAC-Royko (partículas/ml). Día 14

		102PD0089-01				Tampón			
Vial	[Polisorbato-80] %	Agitación		Sin agitación		Agitación		Sin agitación	
		10 µm	25 µm	10 µm	25 µm	10 µm	25 µm	10 µm	25 µm
Antiguo	0	268,0	18,0	0,5	0,0	4,5	2,0	0,0	0,5
Antiguo	0,005	2,0	2,5	1,0	1,0	2,5	0,5	6,0	3,0
Antiguo	0,001	72,0	6,5	7,0	3,0	7,0	1,0	1,0	2,0
Nuevo	0	1335,0	29,0	2,0	0,0	1,5	0,0	1,5	0,5
Nuevo	0,005	7,0	0,5	16,0	0,0	13,5	0,0	13,0	2,0
Nuevo	0,001	38,0	1,5	5,5	0,5	16,0	0,5	8,0	0,0

Los resultados indicaron que el procedimiento de llenado manual genera muy pocas partículas independientemente de la formulación. Tras agitación constante y vigorosa a 180 rpm, eran claramente visibles partículas en viales que contenían rhASB formulada sin polisorbato-80.

La presencia de polisorbato-80 era altamente eficaz en la inhibición de la formación de partículas inducida mecánicamente. La protección era drástica, con recuentos de partículas mantenidos por debajo de niveles esencialmente de fondo en viales agitados de polisorbato-80 al 0,001% y el 0,005%. La concentración de polisorbato-80 al 0,005% muestra una ligera mejora en la reducción de los recuentos de partículas con respecto a la concentración de polisorbato-80 al 0,001%.

No se observó que la agitación o formulación provocase ninguna inestabilidad del producto tal como se evaluó mediante determinación de la actividad, la concentración de proteína, la pureza o el porcentaje de agregación.

Ejemplo 11

Estudio clínico en seres humanos

Se realizó un ensayo clínico de fase 1/2, aleatorizado, de doble ciego de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB) en pacientes con mucopolisacaridosis VI (MPS VI), síndrome de Maroteaux-Lamy, usando producto terminado producido según el proceso discontinuo descrito en el presente documento. Se formuló la rhASB a una concentración de 1 mg/ml, pH 5,8, fosfato de sodio monobásico 9 mM · 1 H₂O, fosfato de sodio dibásico 1 mM · 7 H₂O, cloruro de sodio 150 mM. Cuando se administró a los pacientes, se preparó la rhASB diluyendo la cantidad apropiada de disolución de fármaco en una bolsa intravenosa (i.v.) con solución salina normal a temperatura ambiente. Se medicaron previamente todos los pacientes con una antihistamina antes de la infusión para reducir las posibles reacciones asociadas con la infusión.

Los objetivos de este estudio eran evaluar la seguridad, eficacia y perfil farmacocinético de dos dosis de rhASB como ERT en pacientes con MPS VI. Se aleatorizaron los pacientes en un modo de doble ciego a uno dos grupos de dosis, 0,2 y 1,0 mg/kg. Se administró el fármaco una vez en la semana como una infusión i.v. de cuatro horas. Las medidas de seguridad incluían panel de química completo, análisis de orina, hematograma completo (CBC) con fórmula leucocítica y seguimiento de AA. Se evaluaron para todos los pacientes la respuesta inmunitaria y las reacciones asociadas con la infusión, la activación del complemento y la formación de anticuerpos. Los parámetros de eficacia incluían resistencia/tolerancia al ejercicio (prueba de marcha de 6 minutos), capacidad respiratoria (pruebas de función pulmonar), amplitud de movimiento articular (JROM), estado funcional (cuestionario de evaluación de la salud infantil [CHAQ]), niveles de GAG en orina y cambios en hepatomegalia, agudeza visual, función cardíaca y apnea del sueño.

Se realizaron evaluaciones farmacocinéticas durante las infusiones a las semanas 1, 2, 12, 24 y periódicamente después de eso para medir los niveles de antígeno (enzima) durante y después de la infusión. También se realizaron evaluaciones farmacocinéticas a las semanas 83, 84 y 96 de la extensión abierta del estudio, cuando se cambiaron los pacientes comenzando en la semana 84 a la nueva rhASB purificada mediante el proceso de perfusión en una formulación con polisorbato 80 al 0,005%.

Se incluyeron un total de siete pacientes, y los pacientes incluidos tenían una variedad de características constantes con enfermedad en avance rápido o en avance moderado. Un paciente abandonó el estudio en la semana 3 por motivos personales y se reemplazó. Se realizó un análisis provisional especificado previamente a finalización de las 24 semanas de tratamiento para los seis pacientes restantes. Los datos del análisis provisional de la semana 24 mostraron que rhASB se toleraba bien y la dosis de 1,0 mg/kg parecía producir mayor beneficio clínico y tener un perfil de seguridad comparable al de la dosis de 0,2 mg/kg.

Se les ofreció a los pacientes en el grupo de dosis baja continuar el tratamiento al nivel de dosis de 1,0 mg/kg. Dos pacientes iniciaron la terapia al nivel de dosis superior a intervalos tras la semana 48 (semanas 59 y 69). Los pacientes tratados hasta la semana 96 han recibido la mayoría de las infusiones de rhASB planeadas. Ningún paciente se ha saltado más de dos infusiones en total durante este periodo.

Las evaluaciones de seguridad realizadas durante las 24 semanas iniciales, luego 48 de tratamiento, mostraron que el tratamiento semanal con rhASB a 0,2 ó 1,0 mg/kg se toleraba bien sin diferencias significativas entre los dos grupos de dosis. El tratamiento a más largo plazo (hasta la semana 96) a 1,0 mg/kg semanalmente también se toleraba bien.

Desarrollo de anticuerpo anti-rhASB y niveles de complemento

Los seis pacientes con fármaco de estudio en la semana 30 habían desarrollado anticuerpo frente a rhASB. Los niveles de cuatro de los seis pacientes permanecieron relativamente bajos y disminuyeron desde niveles pico hacia la semana 60. De los dos pacientes que desarrollaron niveles superiores de anticuerpo que los otros cuatro pacientes, los niveles de anticuerpo de un paciente disminuyeron desde el nivel pico en la semana 24, y los niveles del otro paciente se redujeron rápidamente desde el nivel pico en la semana 60. No se han observado cambios constantes en los niveles de complemento CH50, C3 o C4 durante las 96 semanas de tratamiento. Varios pacientes han tenido reducciones intermitentes modestas en los niveles de CH50; sin embargo, no se observaron pruebas de consumo del complemento o correlación entre estos bajos niveles y síntomas asociados con la infusión. La figura 10 muestra los niveles de anticuerpo a lo largo de 96 semanas de tratamiento.

Glicosaminoglicanos en orina

El nivel en orina de GAG es un marcador bioquímico del grado de almacenamiento lisosómico en individuos afectados por MPS. Hacia la semana 24, se redujeron los GAG en orina en un promedio del 70% en el grupo de dosis alta frente al 55% en el grupo de dosis baja. El porcentaje de DS, el producto de almacenamiento primario de MPS VI, disminuyó de manera similar en un 44% y un 18%, respectivamente. El examen del transcurso de tiempo del cambio en la excreción en orina de GAG como función de las semanas de tratamiento mostró una disminución más pronunciada en los GAG en orina totales hacia la semana 6 en el grupo de dosis alta. Estos datos confirman que la dosis superior producía un cambio más grande en tanto GAG en orina como DS. Los GAG en orina han continuado disminuyendo hasta la semana 96 para los pacientes en ambos grupos de tratamiento que permanecían en el estudio. La figura 11 muestra la reducción en los niveles totales de GAG en orina a lo largo de las 96 semanas y la figura 12 muestra una comparación de los niveles en la semana 96 con niveles normales apropiados para la edad. Obsérvese que los dos pacientes en el grupo de dosis de 0,2 mg/kg que permanecían en el estudio, los pacientes 41 y 45, se cambiaron a la dosis de 1,0 mg/kg en las semanas 69 y 59, respectivamente. En la semana 96, estos dos pacientes tenían reducciones en GAG a partir del examen del 85% y el 63%. Éstas eran similares a las reducciones observadas en los pacientes con 1,0 mg/kg a lo largo de las 96 semanas. Los pacientes 42, 43 y 44 tenían reducciones del 64%, el 77% y el 86% a partir del examen, respectivamente. En ambos grupos, los pacientes que tenían niveles de GAG de nivel inicial superiores tenían porcentajes de reducción superiores a los de los pacientes con niveles de GAG que estaban más próximos al intervalo normal (<5 veces el límite superior de la normalidad, es decir, la media más 2 DE).

Resistencia

La prueba de marcha de 6 minutos sirvió como medida clínica primaria de la resistencia. Los dos pacientes que no podían caminar >100 m en el nivel inicial, que se aleatorizaron para recibir 1,0 mg/kg de fármaco de estudio (n.º 43 y n.º 44), tenían grandes mejoras en la distancia total caminada hacia la semana 24. Todos los pacientes excepto el n.º 44, que desarrolló una compresión de la médula espinal C1-C2, mostraron mejora en su distancia caminada hacia las semanas 48 y 96. La figura 13 muestra la mejora en los resultados de la prueba de marcha de 6 minutos a lo largo de las 96 semanas de tratamiento.

Medidas adicionales de eficacia

Se observaron mejoras modestas en varios de otros parámetros de eficacia durante las 96 semanas de tratamiento con fármaco de estudio. La ROM del hombro, particularmente para la flexión, mejoró en cinco de los seis pacientes del estudio en la evaluación de la semana 24. Tres de los cuatro pacientes (n.º 41, 43 y 45) con evaluaciones en la semana 96 seguían mostrando aumentos en la flexión del hombro. También se observaron ligeras mejoras en las medidas de función respiratoria, capacidad vital forzada (FVC) y volumen espiratorio forzado durante un segundo (FEV1), en tres de cuatro pacientes, en la semana 96. La agudeza visual, medible en cuatro de seis pacientes incluidos, mejoró en una o más líneas en tres de estos cuatro pacientes, aunque un paciente tuvo cambios en sus lentes de prescripción durante este periodo. La hepatomegalia, medida mediante exploración de TAC, aunque no es una característica relevante de esta enfermedad, también disminuyó modestamente, particularmente en los pacientes con hígados más grandes en el nivel inicial.

Se observaron pocos cambios en los restantes parámetros de eficacia, incluyendo la función cardiaca mediante ECG, fuerza de agarre y pellizco, cuestionario CHAQ, altura y peso, densidad mineral ósea y estudios del sueño. No se observó deterioro significativo en ninguno de estos parámetros a lo largo de las 96 semanas.

5 Farmacocinética

Se realizaron evaluaciones farmacocinéticas durante las semanas 1, 2, 12 y 24 del estudio de doble ciego y durante las semanas 83, 84 y 96 de la extensión abierta. Comenzando en la semana 84, los pacientes comenzaron a recibir rhASB fabricada mediante el proceso de perfusión descrito en el ejemplo 9.

Se recogieron muestras de sangre durante la infusión a los 0, 15, 30, 60, 90 y 180 minutos, al final de la infusión a los 240 minutos y tras la infusión a los 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 240 minutos. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos para rhASB usando métodos no compartimentales. Se calcularon las áreas bajo la curva de concentración plasmática-tiempo hasta el infinito y el primer momento usando el método trapezoidal lineal hasta el último punto con una concentración por encima del límite calificado de cuantificación.

Para pacientes a los que se les administraron 0,2 mg/kg/semana, los valores medios para AUC_{0-t} eran relativamente constantes desde la semana 1 hasta la semana 24 ($10,009 \pm 5,107$ en la semana 1, $11,232 \pm 3,914$ en la semana 2, $13,812 \pm 9,230$ en la semana 12 y $13,812 \pm 9,230$ en la semana 24). Para la cohorte de 1,0 mg/kg/semana, los valores medios para AUC eran $94,476 \pm 13,785$ en la semana 1, $180,909 \pm 46,377$ en la semana 2, $157,890 \pm 45,386$ en la semana 12 y $251,907 \pm 201,747$ en la semana 24. Para este grupo de 1,0 mg/kg/semana, el aumento en los valores para AUC_{0-t} y AUC_{∞} y la desviación estándar grande se debían a un único paciente cuyas AUC eran aproximadamente 2 veces superiores a los de otros dos pacientes en el grupo.

La comparación de los valores medios para AUC_{0-t} entre las cohortes de 0,2 y 1,0 mg/kg/semana mostró un aumento bastante en exceso del aumento de 5 veces en la dosis, lo que indica que la farmacocinética de rhASB era no lineal a lo largo de este intervalo de dosis.

Se muestran los parámetros farmacocinéticos a las semanas 83, 84 y 96 en la tabla 27 a continuación.

Tabla 27

Parámetro	Semana 83	Semana 84	Semana 96
C _{máx.} (ng/ml)	1.143 ± 284	1.367 ± 262	1.341 ± 523
T _{máx.} (min.)	180	120	121
AUC_{0-t} (min.·ng/ml)	172.423 ± 49.495	213.713 ± 45.794	200.116 ± 76.506
AUC_{∞} (min.·ng/ml)	173.570 ± 49.969	215.383 ± 47.018	201.157 ± 77.248
CL (ml/min./kg)	$6,23 \pm 2,10$	$4,81 \pm 0,99$	$5,54 \pm 2,09$
V _z (ml/kg)	$67,6 \pm 22,0$	$122 \pm 60,2$	$123 \pm 17,4$
V _{ss} (ml/kg)	$266 \pm 52,3$	$236 \pm 21,1$	$233 \pm 27,6$
t _{1/2} (min.), semivida	$8,49 \pm 4,68$	$19,0 \pm 13,2$	$17,3 \pm 8,26$
MRT (min.)	$44,4 \pm 7,61$	$50,9 \pm 12,9$	$46,1 \pm 16,1$

Se notifican la media aritmética y la desviación estándar excepto para T_{máx.} que es la mediana. Se notificaron valores de pacientes individuales si $n < 3$.

Los parámetros para la semana 83 eran comparables a los obtenidos desde las semanas 2 hasta 24 (excluyendo un paciente con AUC altas), lo que indica la constancia en la farmacocinética de rhASB tras la exposición semanal durante aproximadamente 18 meses. Desde la semana 83 hasta la semana 84, los valores de AUC medios tendían hacia arriba en aproximadamente el 25% mientras que el aclaramiento corporal total tendía hacia abajo en aproximadamente el 25%. Desde la semana 83 hasta la semana 84, la semivida aumentó desde aproximadamente 8,5 minutos hasta 17-19 minutos. Los parámetros de la semana 96 eran comparables a los de la semana 84. Aunque estos datos farmacocinéticos eran de un pequeño número de pacientes y había un solapamiento sustancial de valores individuales, estos resultados indicaron que la preparación de rhASB de alta pureza obtenida a partir del proceso modificado descrito en el ejemplo 9 tenía una semivida más larga que la preparación de rhASB original.

45 Ejemplo 12

Estudio clínico adicional en seres humanos

Se realizó un ensayo clínico abierto de fase 2 de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB)

en pacientes con mucopolisacaridosis VI (MPS VI), síndrome de Maroteaux-Lamy, usando producto terminado producido según el nuevo proceso de perfusión descrito en el ejemplo 9. Se formuló la rhASB a una concentración de 1 mg/ml, pH 5,8, fosfato de sodio monobásico 9 mM, · 1 H₂O, fosfato de sodio dibásico · 7 H₂O, cloruro de sodio 150 mM, polisorbato 80 al 0,005%.

Los objetivos de este estudio eran evaluar la seguridad, eficacia y farmacocinética de rhASB 1,0 mg/kg administrada como una infusión i.v. semanalmente. Se modificaron los criterios de inclusión para este estudio para incluir un conjunto relativamente uniforme de pacientes con resistencia alterada. Los pacientes tenían que poder caminar al menos 1 m pero no más de 250 m en los primeros seis minutos de una prueba de marcha de 12 minutos en el nivel inicial. Los otros criterios de inclusión y exclusión eran similares a los del estudio de fase 1/2 porque los pacientes tenían que tener al menos cinco años de edad y tener un diagnóstico genético o bioquímico documentado. Además de la prueba de marcha, se incluyeron en este estudio varios criterios de evaluación no estudiados previamente en pacientes con MPS.

Las medidas de seguridad incluían evaluaciones de laboratorio clínico, análisis de orina, CBC con fórmula leucocítica, ECG y seguimiento de AA. Están evaluándose las reacciones asociadas con la infusión así como el consumo del complemento y la formación de anticuerpos para todos los pacientes. Los parámetros de eficacia incluían medidas de resistencia y movilidad, incluyendo una prueba de marcha de 12 minutos, la prueba cronometrada de levantarse y caminar, la prueba de subir escaleras de 3 minutos y actividad física. Se evaluaron efectos subjetivos, tales como dolor articular y rigidez articular, con un cuestionario, y también se evaluaron otras medidas en la escala de desarrollo de Denver tales como el tiempo en atarse los zapatos, tocarse la parte superior de la cabeza, quitarse el jersey y recoger monedas y ponerlas en una taza. Las medidas de eficacia adicionales incluían medidas de agudeza visual, estudios de densidad ósea, evaluación de la fuerza de agarre y pellizco, ROM del hombro, estado funcional, función pulmonar, excreción de GAG en orina, exámenes visuales, función cardíaca y saturación de oxígeno durante el sueño. Se realizaron evaluaciones farmacocinéticas durante las infusiones a las semanas 1, 2, 12 y 24 para medir los niveles de antígeno (enzima) durante y después de la infusión. Se incluyeron diez pacientes, cinco en los Estados Unidos y cinco en Australia. Todos los pacientes completaron la semana 24 de tratamiento. No hubo ninguna muerte o interrupción. Todos los pacientes recibieron las 24 infusiones de fármaco de estudio; por tanto, se incluyeron todos los pacientes en los análisis de eficacia y seguridad.

Como en el estudio de fase 1/2, había una amplia heterogeneidad de la gravedad de la enfermedad entre los pacientes con MPS VI incluidos en el estudio de fase 2. Varios pacientes tenían también características neurológicas de la enfermedad, incluyendo hidrocefalia comunicante, inestabilidad de la médula espinal cervical y enfermedad de los discos de la médula espinal.

Evaluaciones de laboratorio clínico

No se observaron anomalías de laboratorio clínicamente significativas en estos pacientes a lo largo del periodo de 24 semanas.

Estudios de complemento y anticuerpos anti-rhASB

Ocho de los 10 pacientes desarrollaron anticuerpos frente a rhASB hacia la semana 24. De los tres pacientes que desarrollaron niveles superiores de anticuerpo que los otros pacientes, los niveles de anticuerpo de dos pacientes siguieron elevándose después de la semana 24 pero parecían haberse estabilizado hacia la semana 48. Estos dos pacientes o bien eran del genotipo "nulo" o bien tenían una mutación en presunto sitio antigénico principal para ASB. La reducción en GAG en orina era menor para estos dos pacientes en comparación con los otros. La figura 14 muestra los niveles de anticuerpo a lo largo de 48 semanas de tratamiento.

En la semana 24, un paciente tenía valores de C4 y CH50 disminuidos, tanto antes como después de la infusión de la semana 12, lo que se consideró que era clínicamente significativo por el investigador. C4 y CH50 estaban ligeramente por debajo del límite inferior de la normalidad antes de la infusión y mostraron una mayor disminución tras la infusión. Aunque estos resultados sugerían la posibilidad de consumo del complemento, no se observó ningún signo o síntoma clínico consecuente con tal consumo. No se observaron anomalías clínicamente significativas en los niveles de complemento en ninguno de los otros pacientes en el estudio.

Glicosaminoglicanos en orina

La reducción media en los niveles de GAG en orina era rápida, alcanzando un nadir en la semana 6, y permaneciendo relativamente constante desde la semana 6 hasta la semana 24. Hacia la semana 24, se redujeron los GAG en orina en un promedio del 71%, y hacia la semana 48 se redujeron los GAG en orina en un promedio del 76%. Los diez pacientes mostraron una disminución en los niveles de GAG en orina que se aproximaron al intervalo normal tras 24 semanas de tratamiento. Estos datos concuerdan con los resultados observados para los siete pacientes en el estudio de fase 1/2. La figura 15 muestra la reducción en los niveles totales de GAG en orina a lo largo de las 48 semanas y la figura 16 muestra una comparación de los niveles en la semana 48 con niveles normales apropiados para la edad.

Medidas de resistencia

Se evaluó la distancia caminada en una prueba de marcha de 12 minutos para todos los pacientes en el nivel inicial y cada seis semanas después. Se registró la distancia como la media de dos mediciones separadas en cada evaluación y se determinó a tanto 6 minutos como 12 minutos.

En el nivel inicial, las distancias medias caminadas a los 6 y 12 minutos eran 152,4 ($\pm 75,0$) y 264,0 ($\pm 161,7$) metros, respectivamente. En la semana 24, la distancia media caminada a los 6 minutos había mejorado en 57,3 ($\pm 59,0$) metros (el 62% por paciente), mientras que la distancia media caminada a los 12 minutos había mejorado en un promedio de 155 metros (el 98% por paciente). Todos los pacientes mejoraron su distancia caminada a los 12 minutos, y todos menos un paciente mejoraron en los primeros 6 minutos de la marcha. En la semana 48, la mejora promedio en la prueba de marcha de 12 minutos era de 212 metros (el 138% por paciente). La figura 17 muestra la mejora en los resultados de la prueba de marcha de 12 minutos a lo largo de las 48 semanas.

Subir escaleras durante 3 minutos fue la segunda medida de resistencia sometida a prueba. En el nivel inicial, los pacientes podían subir una media de 50,3 ($\pm 29,5$) escalones. Hacia las 24 semanas, el número medio de escalones subidos había aumentado hasta 98,1 ($\pm 62,5$) escalones, una mejora de 48 escalones o el 110% por paciente ($\pm 116\%$). Hacia las 48 semanas, el número promedio de escalones subidos había aumentado en 61 escalones hasta un total de 111 escalones, una mejora del 147% por paciente. La figura 18 muestra la mejora en los resultados de subir escaleras durante 3 minutos a lo largo de las 48 semanas. Los pacientes variaban enormemente en cuanto al número de escalones subidos, y el rendimiento en el nivel inicial no se correlacionaba necesariamente con el grado de mejora en la semana 24.

Medidas de eficacia adicionales

Se evaluaron varios parámetros de eficacia adicionales durante las primeras 24 semanas de este estudio. Se usó la prueba cronometrada de levantarse y caminar como una medida de la capacidad funcional general. Globalmente, no hubo ninguna reducción significativa en el tiempo total necesario para esta prueba entre el nivel inicial y la semana 24, pero hubo una modesta mejora hacia la semana 48. La figura 19 muestra los resultados de la prueba cronometrada de levantarse y caminar a lo largo de las 48 semanas de tratamiento.

Se realizaron medidas de tiempo espiratorio forzado (FET), FVC y FEV1 para evaluar la función pulmonar. La tabla 28 a continuación presenta los valores de la función pulmonar en el nivel inicial, la semana 24 y la semana 48 y también muestra la mejora en la altura y la organomegalia en la semana 48. No se observaron cambios significativos en estos parámetros a lo largo del periodo de 24 semanas. En la semana 48, 5/10 pacientes mejoraron en FVC y FEV1, de los cuales 3 de los 5 mostraron mejora pese a menos de un 2% de cambio en el crecimiento. En la semana 48, hubo también una mejora del 43% en promedio en el tiempo espiratorio forzado (>1 segundo).

Tabla 28
Función pulmonar frente a crecimiento y organomegalia

Paciente	Edad	Altura en el nivel inicial (cm)	FVC en el nivel inicial (litros)	FVC en la semana 24	FVC ¹ en la semana 48	Cambio en la altura [cm] (%)	% Δ de hígado, semana 48 ²	% Δ de hígado relativo, semana 48	% Δ de bazo, semana 48 ³	% Δ de bazo relativo, semana 48 ³
200	18	96,2	0,47	0,44	0,48	-0,05 (<1)	-6,3	-15,2*	-5,88	-13,90
201	9	93,2	0,52	0,54	0,60	6,65 (7,1)	-2,3	-14,4*	-8,82	-20,17
202	17	120	0,75	ND	0,92	0,55 (<1)	-6,7	-5,3	-27,81	-26,69
203	15	107	0,28	0,27	0,38	1,9 (1,8)	-8,6	-12,5	-16,45	-20,22
204	7	87	0,52	0,60	0,50	3,8 (4,4)	-1,3	-4,5	-6,74	-9,71
300	22	102,4	0,37	0,39	0,37	2,5 (2,4)	-15,5	-20*	-16,58	-21,09
301	9	121,1	1,40	1,46	1,55	4,9 (4,0)	+26,3	+3	19,67	-2,56
302	6	99,7	0,81	0,85	0,83	4,8 (4,8)	+5,7	-13	-1,92	-19,99
303	8	84,6	0,16	0,27	0,31	1,1 (1,3)	-5,8	-13+	-45,33	-49,38
304	16	124,7	0,83	0,74	0,83	1,3 (1,0)	-2,8	-15*	6,93	-6,03

¹ Los valores en negrita indican valores de FVC que representan aumentos clínicamente significativos

² Tamaño de hígado medio en el nivel inicial $681,6 \pm 118$ cc

³ Tamaño del bazo medio en el nivel inicial $146,8 \pm 40$ cc

*Volúmenes del hígado por encima del 95% del límite ajustado a la edad con respecto al peso corporal en el nivel inicial, y dentro de límites normales en la semana 48

+Volúmenes del hígado por encima del 95% del límite ajustado a la edad con respecto al peso corporal en el nivel inicial y la semana 48

5

Tabla 29

Movimiento del hombro	Nivel inicial	Amplitud de movimiento del hombro	
		Cambio en la semana 24 (grados de función)	Cambio en la semana 48
Todos los pacientes (n=10)			
Flexión activa	102	6	3
Flexión pasiva	116	4	(1)
Extensión activa	52	5	5
Extensión pasiva	63	9	(6)
Rotación lateral activa	59	7	6
Rotación lateral pasiva	69	9	(6)
Pacientes con flexión en el nivel inicial <90° (n=3)			
Flexión activa	85	9	5
Extensión activa	50	6	4
Rotación lateral activa	52	7	7

10

Se evaluó la ROM del hombro (flexión, extensión, rotación) de manera tanto activa como pasiva. Globalmente para el grupo, se observó un porcentaje de aumento modesto en la ROM tanto activa como pasiva; sin embargo, algunos pacientes mostraron una disminución en algunas medidas a las 24 semanas. A las 48 semanas, había una gran variabilidad en los resultados debido a varios resultados atípicos; sin embargo, seguía habiendo una mejora en la ROM del hombro particularmente en pacientes que tenían menos de 90 grados de flexión en el nivel inicial. La tabla 29 anterior presenta los grados de amplitud de movimiento del hombro en el nivel inicial, la semana 24 y la semana 48.

15

20

Se evaluaron el dolor y la rigidez usando un cuestionario. Mientras que dos pacientes no tuvieron ningún cambio en la puntuación de dolor, siete pacientes mostraron mejora en el dolor hacia la semana 24 (un paciente no tenía evaluación en el nivel inicial). Los nueve pacientes evaluados mostraron mejora en la rigidez en la semana 24. El dolor y la rigidez evaluados usando el cuestionario siguieron mejorando hacia la semana 48. Se muestran los resultados del cuestionario de dolor articular y el cuestionario de rigidez articular a lo largo de 48 semanas de tratamiento en las figuras 20 y 21, respectivamente.

25

Se observaron mejoras significativas en la fuerza de agarre a lo largo de todos los grupos de pacientes. Siete pacientes tuvieron mejoras en la fuerza de agarre para una o ambas manos. Se observaron pocos cambios en la prueba de pellizco a lo largo del periodo de 24 semanas. Hubo pocos cambios significativos observados en las otras evaluaciones de la calidad de vida, excepto que en la semana 48 hubo una mejora modesta en la destreza y sensibilidad (tal como se mide mediante la prueba de recogida de monedas).

30

Se midieron los niveles de actividad usando el dispositivo ActiTrac® acoplado al cinturón. No se observaron cambios significativos en el nivel de actividad

35

No se observaron cambios significativos en las evaluaciones de la función cardiaca (ECG) o en la talla o longitud supina. Estudios del sueño realizados en un subconjunto de pacientes no mostraron cambios clínicamente significativos.

40

Lista de secuencias

<110> BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.

<120> N-ACETILGALACTOSAMINA-4-SULFATASA PRECURSORA, MÉTODOS DE TRATAMIENTO USANDO

DICHA ENZIMA Y MÉTODOS PARA PRODUCIR Y PURIFICAR DICHA ENZIMA

<130> P023363EP

<140> 03783223.5

<141> 07-11-2003

5 <150> Documento US 10/290.908

<151> 07-11-2002

<160> 2

<170> Patente In versión 3.2

<210> 1

10 <211> 1656

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

15 <222> (45)..(1643)

<400> 1

```

tagctacagt cggaaaccat cagcaagcag gtcattgttc caac atg ggt ccg cgc      56
                                   Met Gly Pro Arg
                                   1

ggc gcg gcg agc ttg ccc cga ggc ccc gga cct cgg cgg ctg ctc ctc      104
Gly Ala Ala Ser Leu Pro Arg Gly Pro Gly Pro Arg Arg Leu Leu Leu
5                               10                               15                               20

ccc gtc gtc ctc ccg ctg ctg ctg ctg ctg ttg ttg gcg ccg ccg ggc      152
Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Pro Pro Gly
                               25                               30                               35

tcg ggc gcc ggg gcc agc cgg ccg ccc cac ctg gtc ttc ttg ctg gca      200
Ser Gly Ala Gly Ala Ser Arg Pro Pro His Leu Val Phe Leu Leu Ala
                               40                               45                               50

gac gac cta ggc tgg aac gac gtc ggc ttc cac ggc tcc cgc atc cgc      248
Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asp Val Gly Phe His Gly Ser Arg Ile Arg
                               55                               60                               65

acg ccg cac ctg gac gcg ctg gcg gcc ggc ggg gtg ctc ctg gac aac      296
Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Ala Gly Gly Val Leu Leu Asp Asn
70                               75                               80

tac tac acg cag ccg ctg tgc acg ccg tcg cgg agc cag ctg ctc act      344
Tyr Tyr Thr Gln Pro Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ser Gln Leu Leu Thr
85                               90                               95                               100

ggc cgc tac cag atc cgt aca ggt tta cag cac caa ata atc tgg ccc      392
Gly Arg Tyr Gln Ile Arg Thr Gly Leu Gln His Gln Ile Ile Trp Pro
                               105                               110                               115

tgt cag ccc agc tgt gtt cct ctg gat gaa aaa ctc ctg ccc cag ctc      440
Cys Gln Pro Ser Cys Val Pro Leu Asp Glu Lys Leu Leu Pro Gln Leu
                               120                               125                               130

```

ES 2 445 028 T3

cta	aaa	gaa	gca	ggt	tat	act	acc	cat	atg	gtc	gga	aaa	tgg	cac	ctg	488
Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Tyr	Thr	Thr	His	Met	Val	Gly	Lys	Trp	His	Leu	
		135					140					145				
gga	atg	tac	cgg	aaa	gaa	tgc	ctt	cca	acc	cgc	cga	gga	ttt	gat	acc	536
Gly	Met	Tyr	Arg	Lys	Glu	Cys	Leu	Pro	Thr	Arg	Arg	Gly	Phe	Asp	Thr	
	150					155					160					
tac	ttt	gga	tat	ctc	ctg	ggt	agt	gaa	gat	tat	tat	tcc	cat	gaa	cgc	584
Tyr	Phe	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ser	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ser	His	Glu	Arg	
165					170					175					180	
tgt	aca	tta	att	gac	gct	ctg	aat	gtc	aca	cga	tgt	gct	ctt	gat	ttt	632
Cys	Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Arg	Cys	Ala	Leu	Asp	Phe	
				185					190					195		
cga	gat	ggc	gaa	gaa	gtt	gca	aca	gga	tat	aaa	aat	atg	tat	tca	aca	680
Arg	Asp	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Thr	Gly	Tyr	Lys	Asn	Met	Tyr	Ser	Thr	
			200					205					210			
aac	ata	ttc	acc	aaa	agg	gct	ata	gcc	ctc	ata	act	aac	cat	cca	cca	728
Asn	Ile	Phe	Thr	Lys	Arg	Ala	Ile	Ala	Leu	Ile	Thr	Asn	His	Pro	Pro	
		215					220					225				
gag	aag	cct	ctg	ttt	ctc	tac	ctt	gct	ctc	cag	tct	gtg	cat	gag	ccc	776
Glu	Lys	Pro	Leu	Phe	Leu	Tyr	Leu	Ala	Leu	Gln	Ser	Val	His	Glu	Pro	
	230					235					240					
ctt	cag	gtc	cct	gag	gaa	tac	ttg	aag	cca	tat	gac	ttt	atc	caa	gac	824
Leu	Gln	Val	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ile	Gln	Asp	
245				250						255					260	
aag	aac	agg	cat	cac	tat	gca	gga	atg	gtg	tcc	ctt	atg	gat	gaa	gca	872
Lys	Asn	Arg	His	His	Tyr	Ala	Gly	Met	Val	Ser	Leu	Met	Asp	Glu	Ala	
				265					270					275		
gta	gga	aat	gtc	act	gca	gct	tta	aaa	agc	agt	ggg	ctc	tgg	aac	aac	920
Val	Gly	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Leu	Trp	Asn	Asn	
			280					285					290			
acg	gtg	ttc	atc	ttt	tct	aca	gat	aac	gga	ggg	cag	act	ttg	gca	ggg	968
Thr	Val	Phe	Ile	Phe	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Gly	Gln	Thr	Leu	Ala	Gly	
		295					300					305				
ggt	aat	aac	tgg	ccc	ctt	cga	gga	aga	aaa	tgg	agc	ctg	tgg	gaa	gga	1016
Gly	Asn	Asn	Trp	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Lys	Trp	Ser	Leu	Trp	Glu	Gly	
	310					315					320					
ggc	gtc	cga	ggg	gtg	ggc	ttt	gtg	gca	agc	ccc	ttg	ctg	aag	cag	aag	1064
Gly	Val	Arg	Gly	Val	Gly	Phe	Val	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Lys	Gln	Lys	
325					330					335					340	
ggc	gtg	aag	aac	cgg	gag	ctc	atc	cac	atc	tct	gac	tgg	ctg	cca	aca	1112
Gly	Val	Lys	Asn	Arg	Glu	Leu	Ile	His	Ile	Ser	Asp	Trp	Leu	Pro	Thr	
				345					350					355		
ctc	gtg	aag	ctg	gcc	agg	gga	cac	acc	aat	ggc	aca	aag	cct	ctg	gat	1160
Leu	Val	Lys	Leu	Ala	Arg	Gly	His	Thr	Asn	Gly	Thr	Lys	Pro	Leu	Asp	
			360					365					370			
ggc	ttc	gac	gtg	tgg	aaa	acc	atc	agt	gaa	gga	agc	cca	tcc	ccc	aga	1208
Gly	Phe	Asp	Val	Trp	Lys	Thr	Ile	Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	
		375					380					385				

ES 2 445 028 T3

att gag ctg ctg cat aat att gac cca aac ttc gtg gac tct tca ccg	1256
Ile Glu Leu Leu His Asn Ile Asp Pro Asn Phe Val Asp Ser Ser Pro	
390 395 400	
tgt ccc agg aac agc atg gct cca gca aag gat gac tct tct ctt cca	1304
Cys Pro Arg Asn Ser Met Ala Pro Ala Lys Asp Asp Ser Ser Leu Pro	
405 410 415 420	
gaa tat tca gcc ttt aac aca tct gtc cat gct gca att aga cat gga	1352
Glu Tyr Ser Ala Phe Asn Thr Ser Val His Ala Ala Ile Arg His Gly	
425 430 435	
aat tgg aaa ctc ctc acg ggc tac cca ggc tgt ggt tac tgg ttc cct	1400
Asn Trp Lys Leu Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Cys Gly Tyr Trp Phe Pro	
440 445 450	
cca ccg tct caa tac aat gtt tct gag ata ccc tca tca gac cca cca	1448
Pro Pro Ser Gln Tyr Asn Val Ser Glu Ile Pro Ser Ser Asp Pro Pro	
455 460 465	
acc aag acc ctc tgg ctc ttt gat att gat cgg gac cct gaa gaa aga	1496
Thr Lys Thr Leu Trp Leu Phe Asp Ile Asp Arg Asp Pro Glu Glu Arg	
470 475 480	
cat gac ctg tcc aga gaa tat cct cac atc gtc aca aag ctc ctg tcc	1544
His Asp Leu Ser Arg Glu Tyr Pro His Ile Val Thr Lys Leu Leu Ser	
485 490 495 500	
cgc cta cag ttc tac cat aaa cac tca gtc ccc gtg tac ttc cct gca	1592
Arg Leu Gln Phe Tyr His Lys His Ser Val Pro Val Tyr Phe Pro Ala	
505 510 515	
cag gac ccc cgc tgt gat ccc aag gcc act ggg gtg tgg ggc cct tgg	1640
Gln Asp Pro Arg Cys Asp Pro Lys Ala Thr Gly Val Trp Gly Pro Trp	
520 525 530	
atg taggatttca ggg	1656
Met	
<210> 2	
<211> 533	
<212> PRT	
5 <213> <i>Homo sapiens</i>	
<400> 2	
Met Gly Pro Arg Gly Ala Ala Ser Leu Pro Arg Gly Pro Gly Pro Arg	
1 5 10 15	
Arg Leu Leu Leu Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu	
20 25 30	
Ala Pro Pro Gly Ser Gly Ala Gly Ala Ser Arg Pro Pro His Leu Val	
35 40 45	
Phe Leu Leu Ala Asp Asp Leu Gly Trp Asn Asp Val Gly Phe His Gly	
50 55 60	

ES 2 445 028 T3

Ser Arg Ile Arg Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Asn Tyr Tyr Thr Gln Pro Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ser
 85 90 95
 Gln Leu Leu Thr Gly Arg Tyr Gln Ile Arg Thr Gly Leu Gln His Gln
 100 105 110
 Ile Ile Trp Pro Cys Gln Pro Ser Cys Val Pro Leu Asp Glu Lys Leu
 115 120 125
 Leu Pro Gln Leu Leu Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Thr His Met Val Gly
 130 135 140
 Lys Trp His Leu Gly Met Tyr Arg Lys Glu Cys Leu Pro Thr Arg Arg
 145 150 155 160
 Gly Phe Asp Thr Tyr Phe Gly Tyr Leu Leu Gly Ser Glu Asp Tyr Tyr
 165 170 175
 Ser His Glu Arg Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Asn Val Thr Arg Cys
 180 185 190
 Ala Leu Asp Phe Arg Asp Gly Glu Glu Val Ala Thr Gly Tyr Lys Asn
 195 200 205
 Met Tyr Ser Thr Asn Ile Phe Thr Lys Arg Ala Ile Ala Leu Ile Thr
 210 215 220
 Asn His Pro Pro Glu Lys Pro Leu Phe Leu Tyr Leu Ala Leu Gln Ser
 225 230 235 240
 Val His Glu Pro Leu Gln Val Pro Glu Glu Tyr Leu Lys Pro Tyr Asp
 245 250 255
 Phe Ile Gln Asp Lys Asn Arg His His Tyr Ala Gly Met Val Ser Leu
 260 265 270
 Met Asp Glu Ala Val Gly Asn Val Thr Ala Ala Leu Lys Ser Ser Gly
 275 280 285
 Leu Trp Asn Asn Thr Val Phe Ile Phe Ser Thr Asp Asn Gly Gly Gln
 290 295 300
 Thr Leu Ala Gly Gly Asn Asn Trp Pro Leu Arg Gly Arg Lys Trp Ser
 305 310 315 320

ES 2 445 028 T3

Leu Trp Glu Gly Gly Val Arg Gly Val Gly Phe Val Ala Ser Pro Leu
 325 330 335

Leu Lys Gln Lys Gly Val Lys Asn Arg Glu Leu Ile His Ile Ser Asp
 340 345 350

Trp Leu Pro Thr Leu Val Lys Leu Ala Arg Gly His Thr Asn Gly Thr
 355 360 365

Lys Pro Leu Asp Gly Phe Asp Val Trp Lys Thr Ile Ser Glu Gly Ser
 370 375 380

Pro Ser Pro Arg Ile Glu Leu Leu His Asn Ile Asp Pro Asn Phe Val
 385 390 395 400

Asp Ser Ser Pro Cys Pro Arg Asn Ser Met Ala Pro Ala Lys Asp Asp
 405 410 415

Ser Ser Leu Pro Glu Tyr Ser Ala Phe Asn Thr Ser Val His Ala Ala
 420 425 430

Ile Arg His Gly Asn Trp Lys Leu Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Cys Gly
 435 440 445

Tyr Trp Phe Pro Pro Pro Ser Gln Tyr Asn Val Ser Glu Ile Pro Ser
 450 455 460

Ser Asp Pro Pro Thr Lys Thr Leu Trp Leu Phe Asp Ile Asp Arg Asp
 465 470 475 480

Pro Glu Glu Arg His Asp Leu Ser Arg Glu Tyr Pro His Ile Val Thr
 485 490 495

Lys Leu Leu Ser Arg Leu Gln Phe Tyr His Lys His Ser Val Pro Val
 500 505 510

Tyr Phe Pro Ala Gln Asp Pro Arg Cys Asp Pro Lys Ala Thr Gly Val
 515 520 525

Trp Gly Pro Trp Met
 530

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora producida mediante un proceso de perfusión, en la que dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora tiene una pureza al menos igual al o mayor del 99,5% basándose en la proteína total, en la que dicha pureza se mide usando el método de fase inversa (RP-HPLC) y en la que la composición está libre de bandas detectables de aproximadamente 47-48 kDa tras la electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con tinción de Coomassie.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho proceso de perfusión comprende las etapas de:
 - (a) hacer crecer una célula de ovario de hámster chino (CHO) transfectada con un ADN que codifica para *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora;
 - (b) introducir las células de CHO transfectadas en un biorreactor;
 - (c) suministrar un medio de crecimiento al biorreactor;
 - (d) recoger dicho medio que contiene dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora; y
 - (e) retirar sustancialmente las células transfectadas de dicho medio de recogida.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que dichas células de CHO transfectadas se hacen crecer en un biorreactor durante hasta aproximadamente 35 días.
4. Composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora se purifica a partir del fluido de dicho medio mediante:
 - (a) concentrar el fluido hasta aproximadamente 20x;
 - (b) reducir la actividad proteolítica de una proteasa en el fluido que puede escindir dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora, en la que dicha reducción no daña a dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora;
 - (c) hacer pasar el fluido a través de una resina de cromatografía de interacción con el colorante azul Cibracon;
 - (d) hacer pasar el fluido a través de una resina de cromatografía de quelación de cobre;
 - (e) hacer pasar el fluido a través de una resina de cromatografía de interacción hidrófoba con fenilo; y
 - (f) recuperar dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa precursora.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que en la etapa (b) dicha reducción comprende ajustar el pH del fluido a de aproximadamente 4,8 a 5,2.
6. Composición según la reivindicación 4, en la que en la etapa (c) dicha columna de cromatografía de interacción con el colorante azul Cibracon es una columna Blue Sepharose 6 Fast Flow.
7. Composición según la reivindicación 4, en la que en la etapa (d) dicha columna de cromatografía de quelación de cobre es una columna Chelating Sepharose Fast Flow.
8. Composición según la reivindicación 4, en la que en la etapa (e) dicha columna de cromatografía de interacción hidrófoba con fenilo es una columna Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub.
9. Composición según la reivindicación 4, en la que la secuencia temporal de las etapas (c), (d) y (e) es etapa (c), etapa (d) y etapa (e).
10. Composición según la reivindicación 4, en la que en la etapa (f) dicha recuperación comprende diafiltrar el fluido, filtrar el fluido para eliminar el ADN y filtrar el fluido para eliminar virus.
11. Composición farmacéutica que comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende además una disolución de cloruro de sodio y un detergente no iónico.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que la *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora está presente a una concentración de aproximadamente 1-5 mg/ml o de aproximadamente 50 a

aproximadamente 250 unidades por ml.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el tampón es un tampón fosfato de sodio a una concentración de aproximadamente 10-50 mM.

15. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que el pH de la disolución se mantiene a aproximadamente 5,8.

16. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende un polioxietilensorbitano.

17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que el polioxietilensorbitano es polioxietilensorbitano 20 u 80 y la concentración de dicho polioxietilensorbitano 20 u 80 es de aproximadamente el 0,005% (peso/volumen).

18. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 para su uso en el tratamiento de una enfermedad producida en su totalidad o en parte por una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa.

19. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en la que la enfermedad es mucopolisacaridosis, MPS VI o síndrome de Maroteaux-Lamy.

20. Uso de una *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora que tiene una pureza al menos igual al o mayor del 99,5% basándose en la proteína total según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad producida en su totalidad o en parte por una deficiencia en *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa.

21. Uso según la reivindicación 20, en el que la enfermedad es una mucopolisacaridosis.

22. Uso según la reivindicación 21, en el que la enfermedad es MPS VI.

23. Uso según la reivindicación 20, en el que la enfermedad es síndrome de Maroteaux-Lamy.

24. Uso según la reivindicación 20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en donde dicho paciente tiene aproximadamente un 10% o menos de una actividad de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa normal.

25. Uso según la reivindicación 20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en donde han de administrarse al menos aproximadamente 50 unidades/kg o al menos aproximadamente 1 mg/kg de dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora semanalmente a dicho paciente.

26. Uso según la reivindicación 20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en donde han de administrarse al menos aproximadamente 100 unidades o 2,0 mg/kg de dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora semanalmente a dicho paciente.

27. Composición farmacéutica que comprende una composición según la reivindicación 1 y un polioxietilensorbitano a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,002% y aproximadamente el 0,008% (peso/volumen).

28. Composición farmacéutica según la reivindicación 27, en la que dicho polioxietilensorbitano es polioxietilensorbitano 80 a una concentración del 0,005% (peso/volumen).

29. Uso según la reivindicación 20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en donde el medicamento es para el tratamiento de un ser humano y la cantidad de dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora es eficaz para proporcionar uno o más efectos beneficiosos seleccionados del grupo que consiste en movilidad articular, dolor articular, rigidez articular, tolerancia al ejercicio, resistencia al ejercicio, función pulmonar, agudeza visual y actividades de la vida diaria.

30. Uso según la reivindicación 20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en donde el medicamento es para el tratamiento de un ser humano y dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora ha de administrarse a una dosis de al menos 0,2 mg/kg por semana.

31. Uso o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 30, en donde dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora ha de administrarse a una dosis de al menos 1 mg/kg por semana.

32. Uso o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 30, en donde dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora ha de administrarse a una dosis de 1 mg/kg por semana.

33. Uso según la reivindicación 20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 18, en donde

dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora ha de administrarse a través de una infusión una vez a la semana a lo largo de un periodo de 2 a 4 horas.

- 5 34. Uso de o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 33, en donde dicha *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana precursora ha de administrarse a través de una infusión una vez a la semana a lo largo de un periodo de 4 horas.

FIG. 1

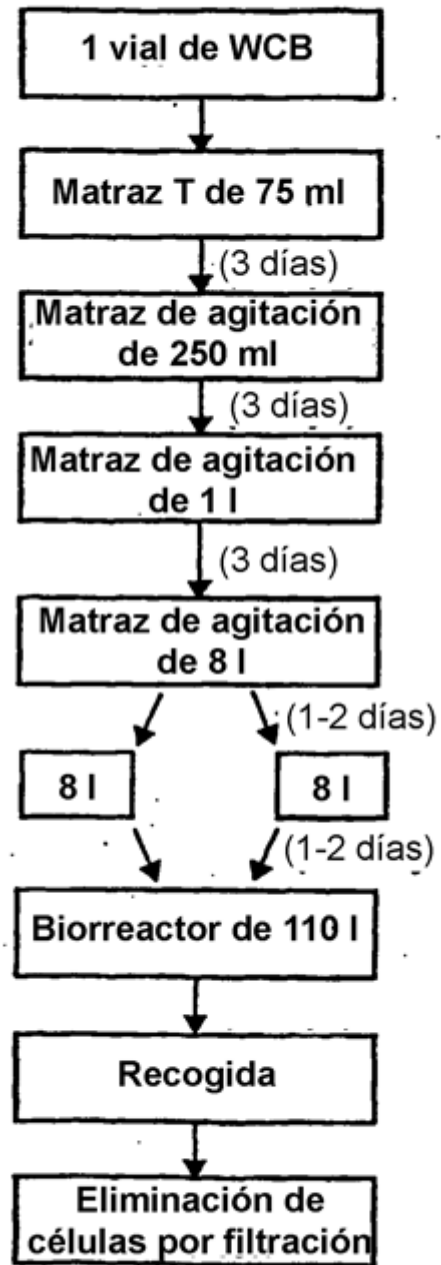


FIG. 2

Esquema resumen del procedimiento de purificación del principio activo rhASB

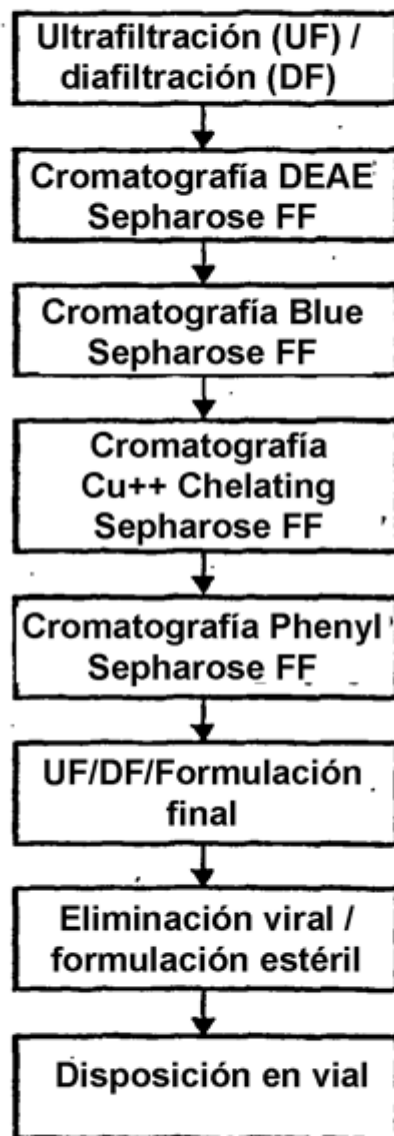


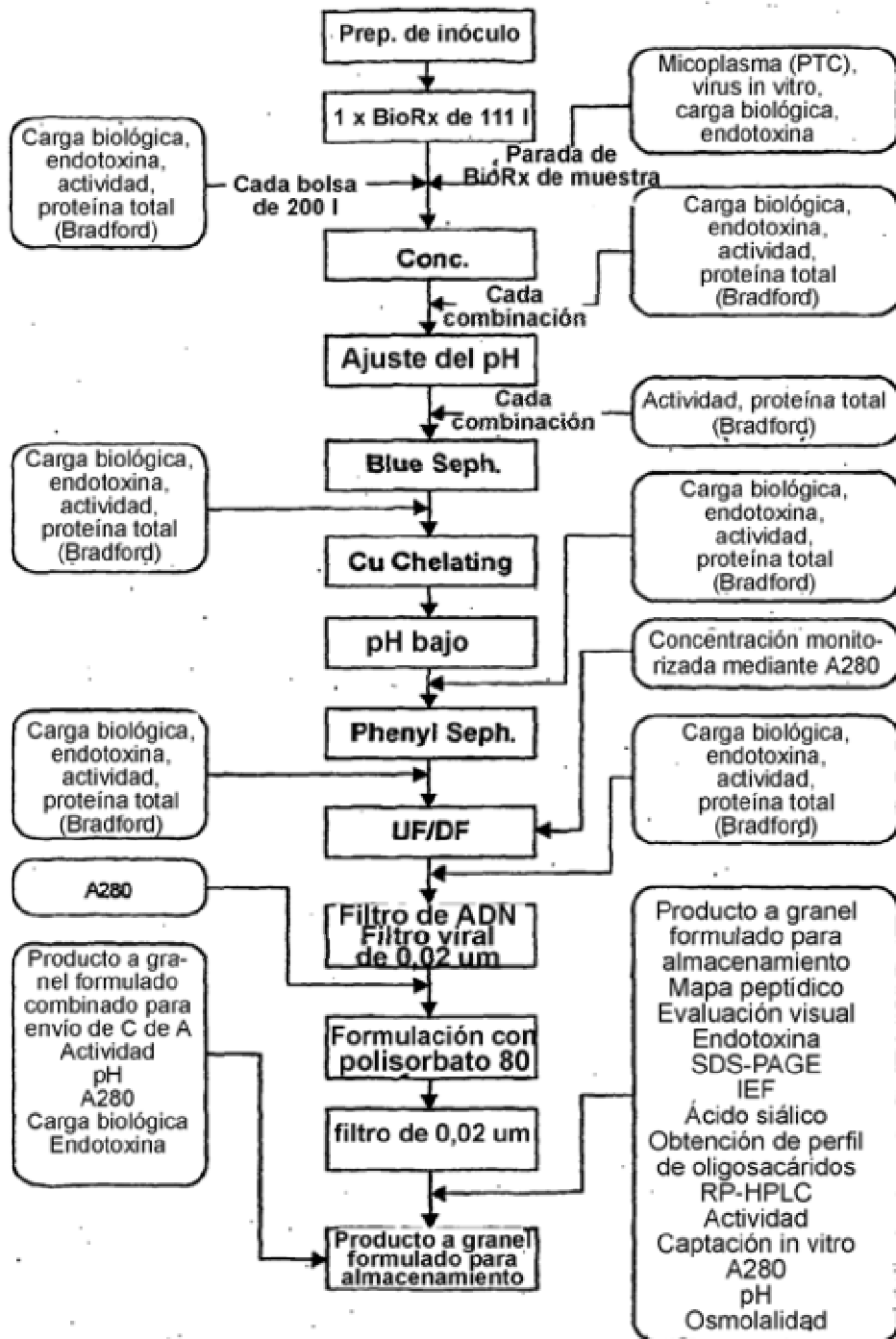
FIG. 3**Diagrama de flujo del procedimiento - Plan de toma de muestras**

FIG. 4A

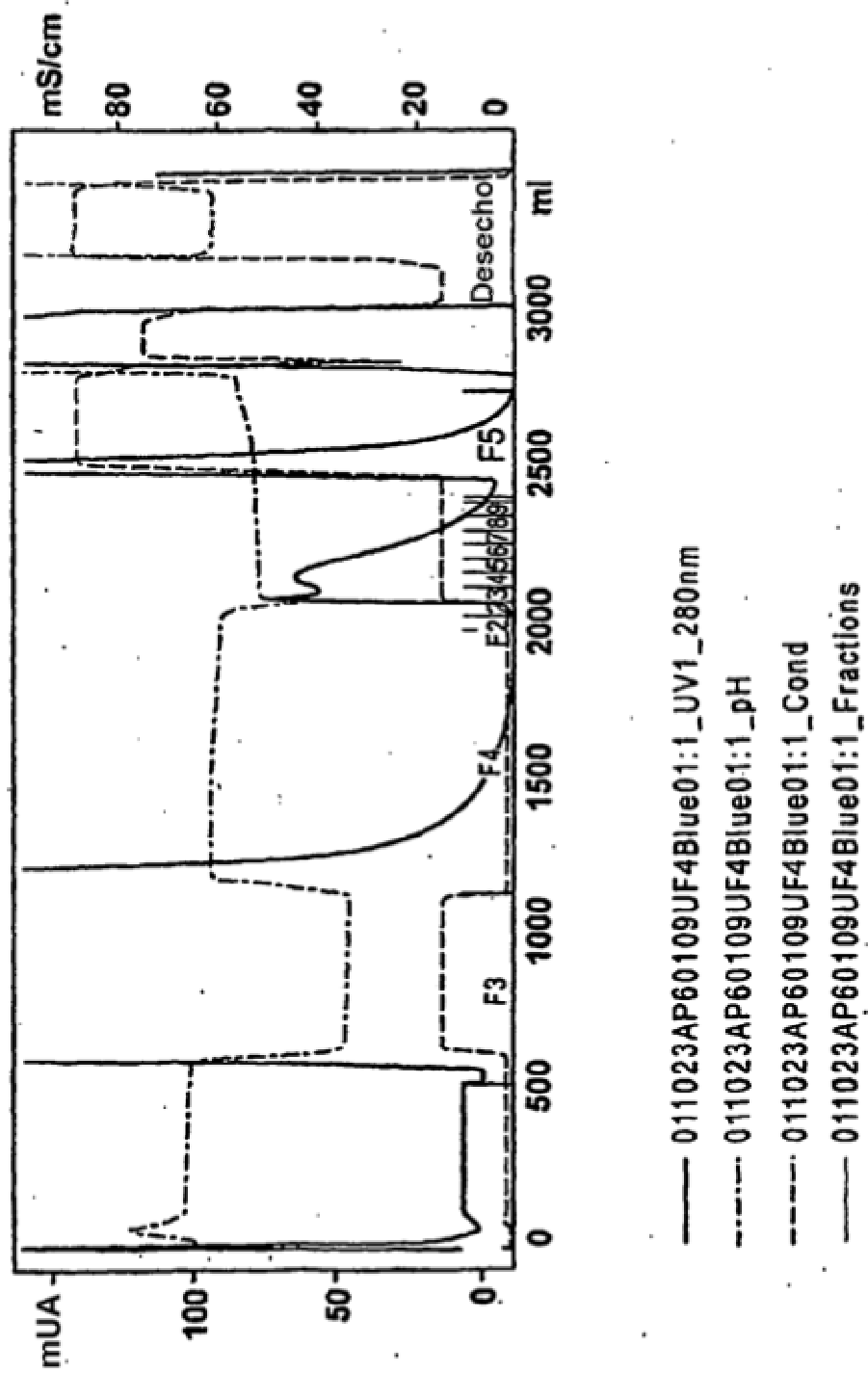


FIG. 4B

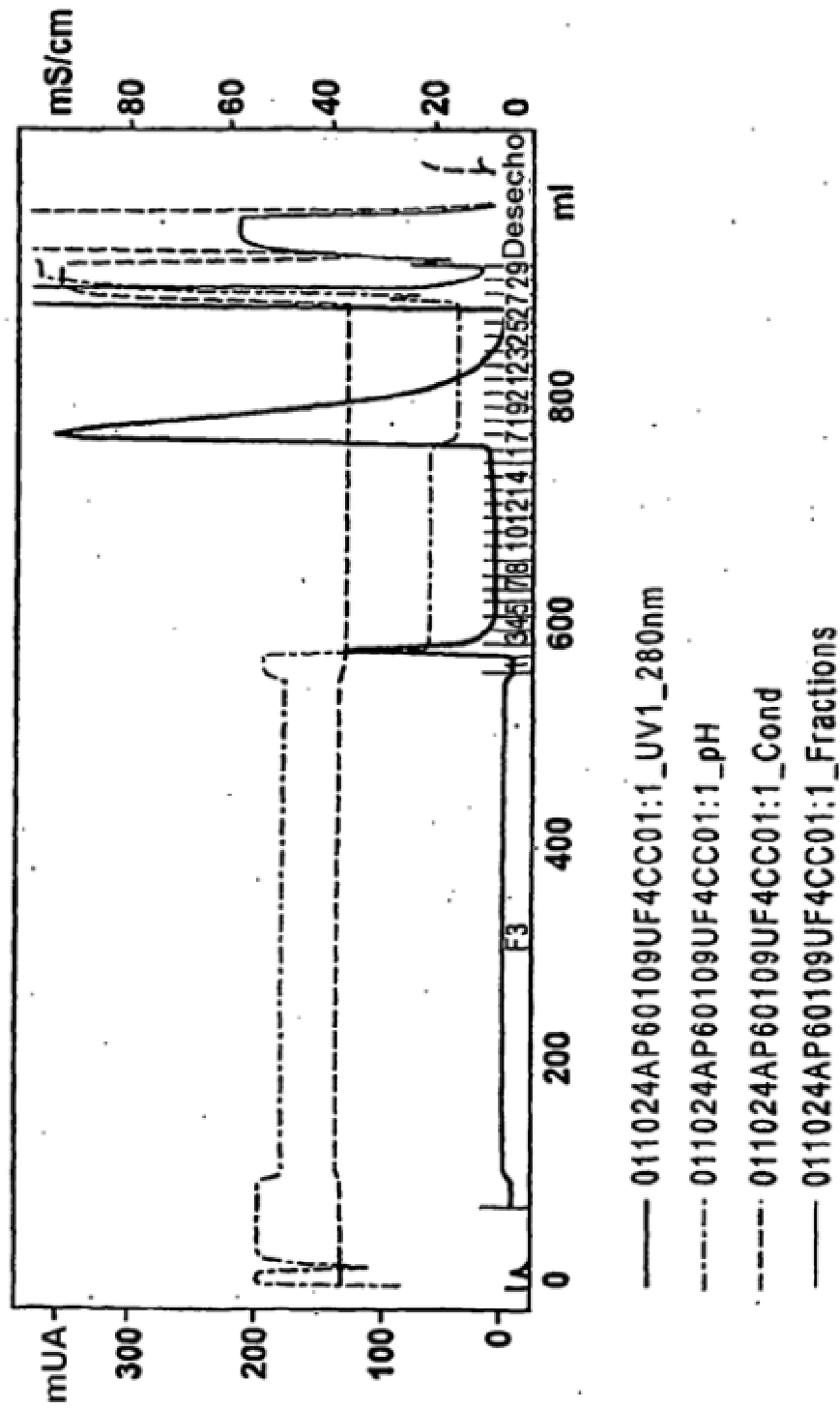


FIG. 4C

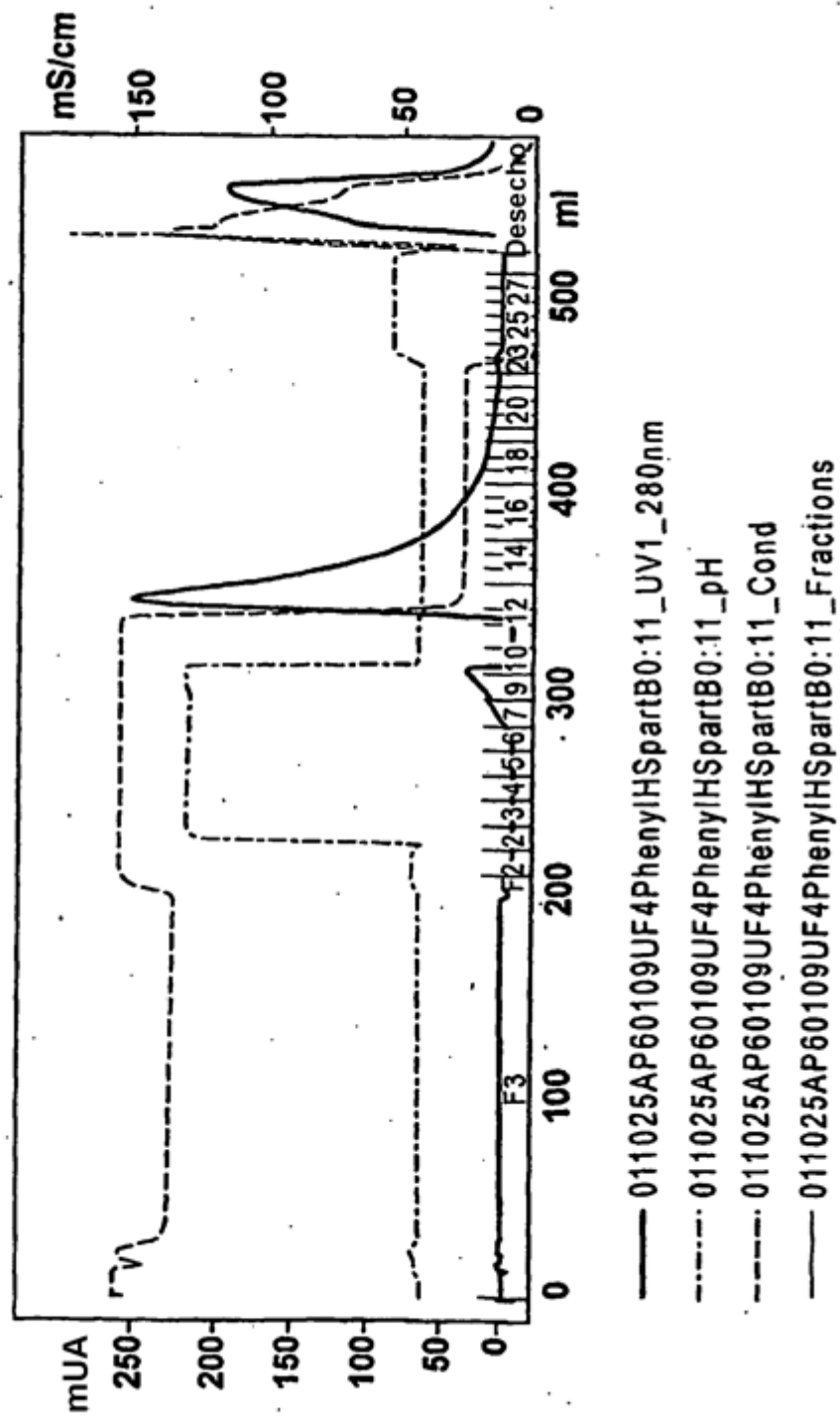
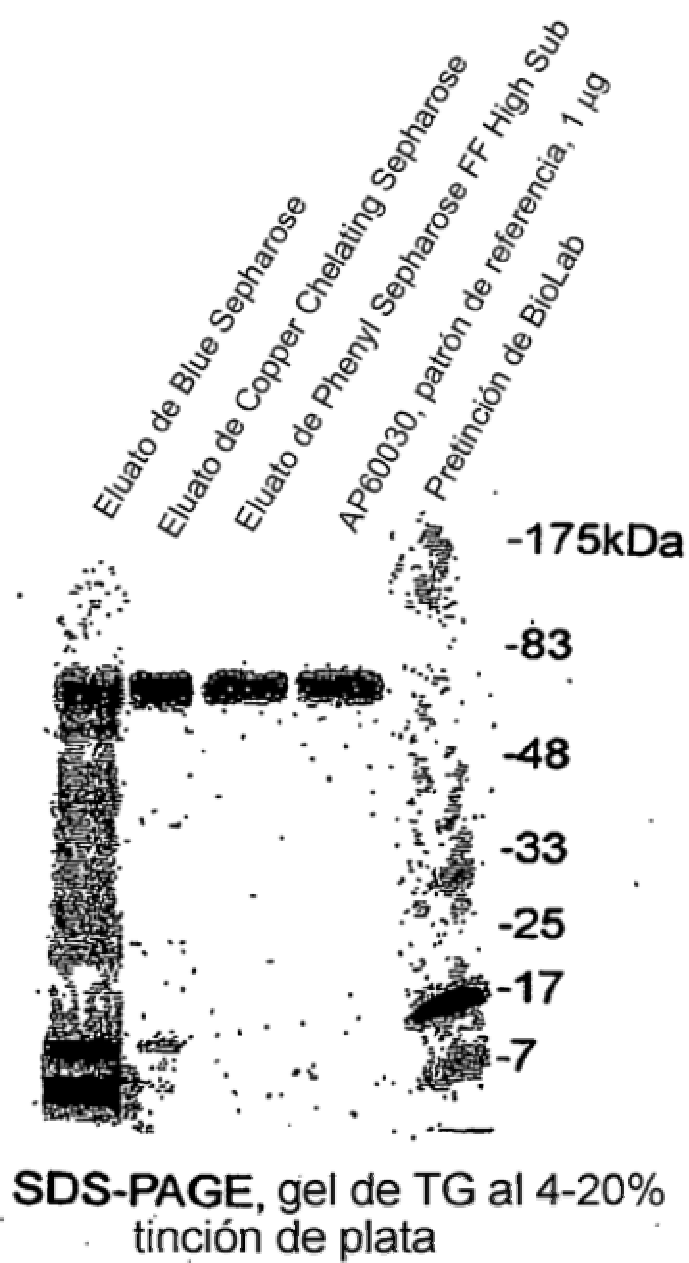
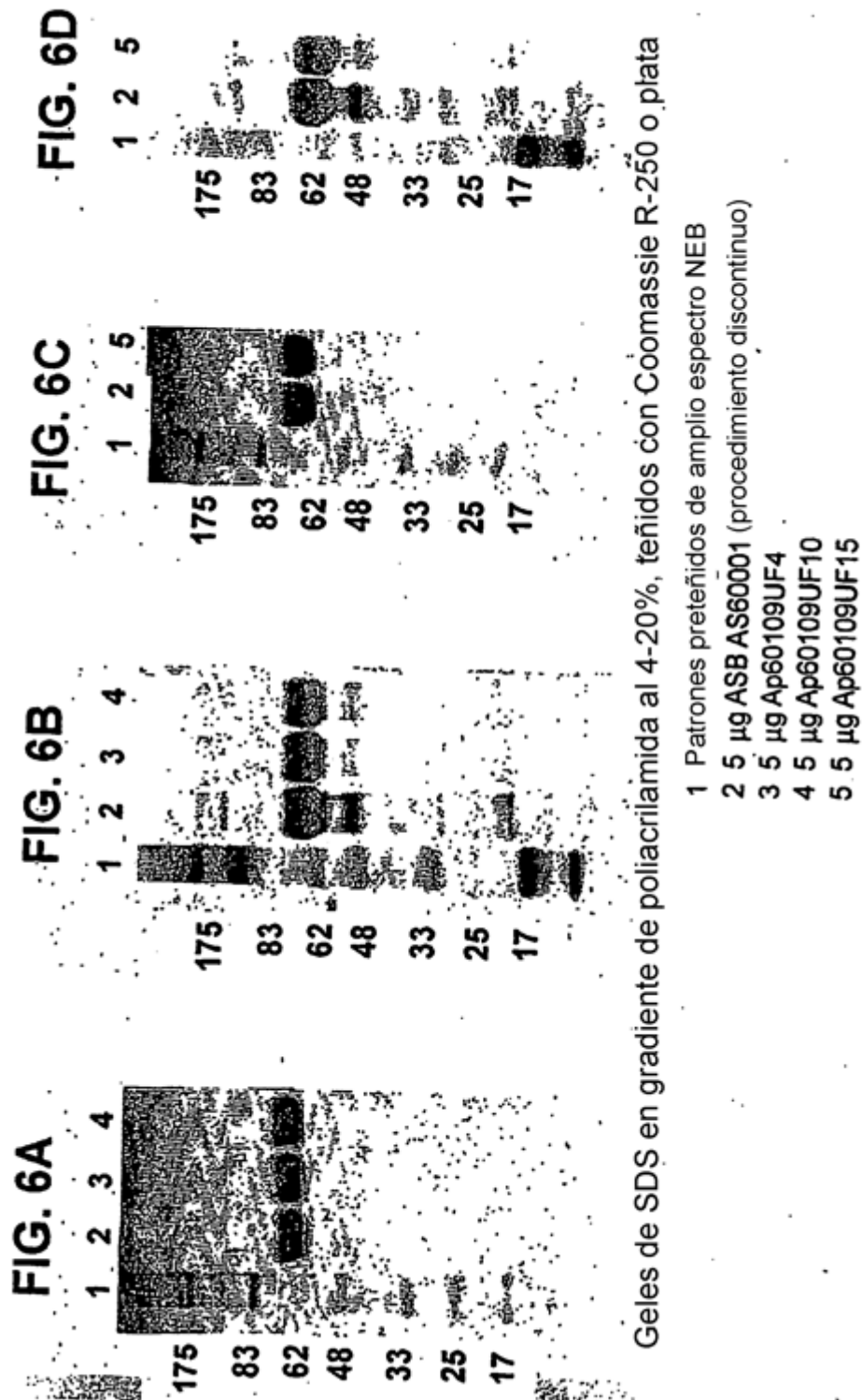


FIG. 5





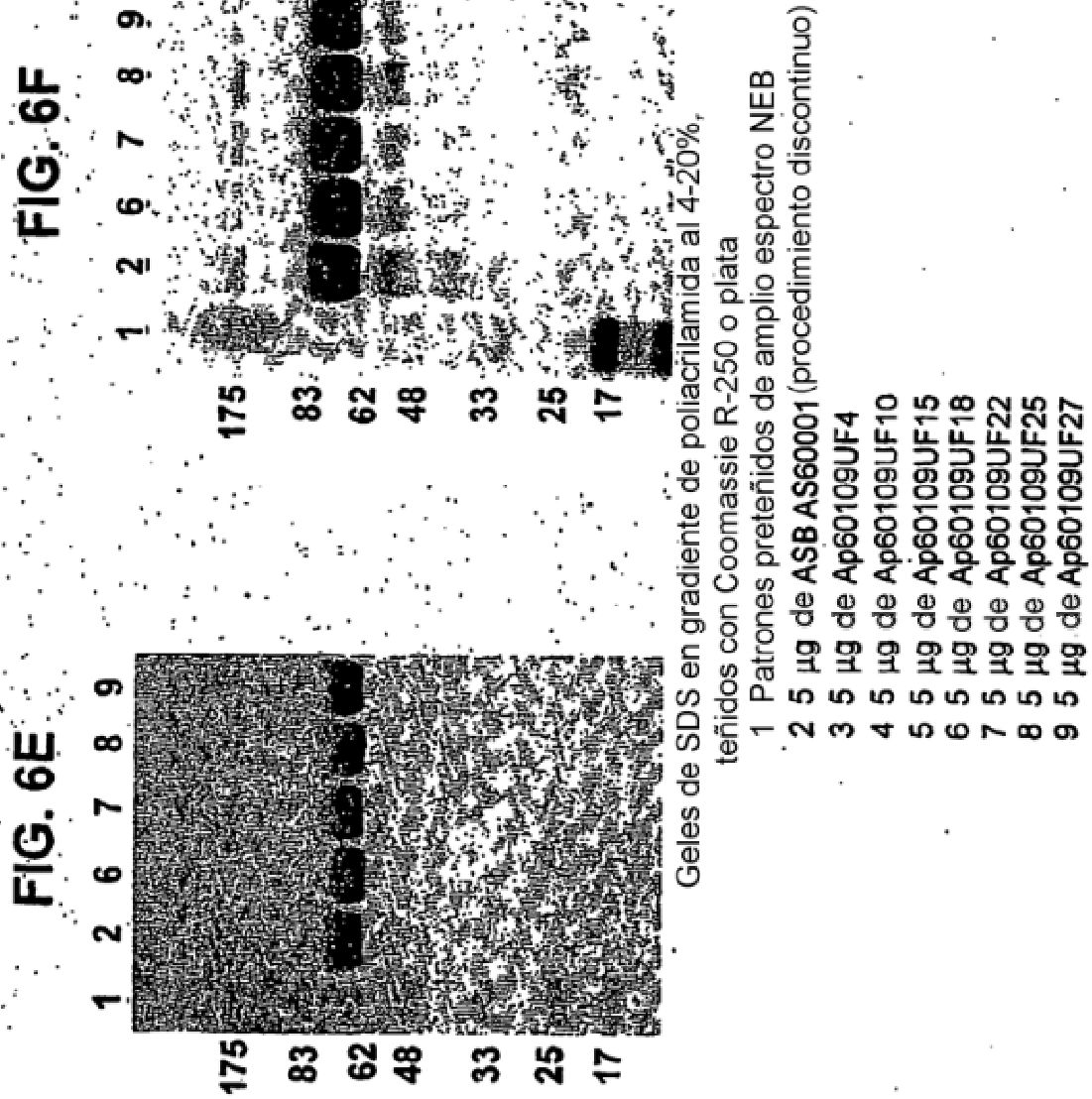
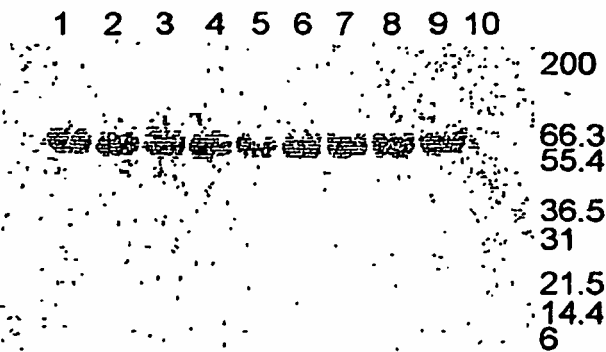


FIG. 7A

rhASB formulado, 052202
5 ug/carril



FIG. 7B



- | | |
|------------------|--------------------|
| 1. AP60202 UF 4 | 6. 102PD0139xB5 |
| 2. AP60202 UF 10 | 7. rhASB-202-002 |
| 3. AP60202 UF 18 | 8. 102PD0136 P1 |
| 4. AP60202 (BMK) | 9. 102PD0136 P2 |
| 5. 102PD0139xB3 | 10. Patrón Mark 12 |

FIG. 8A

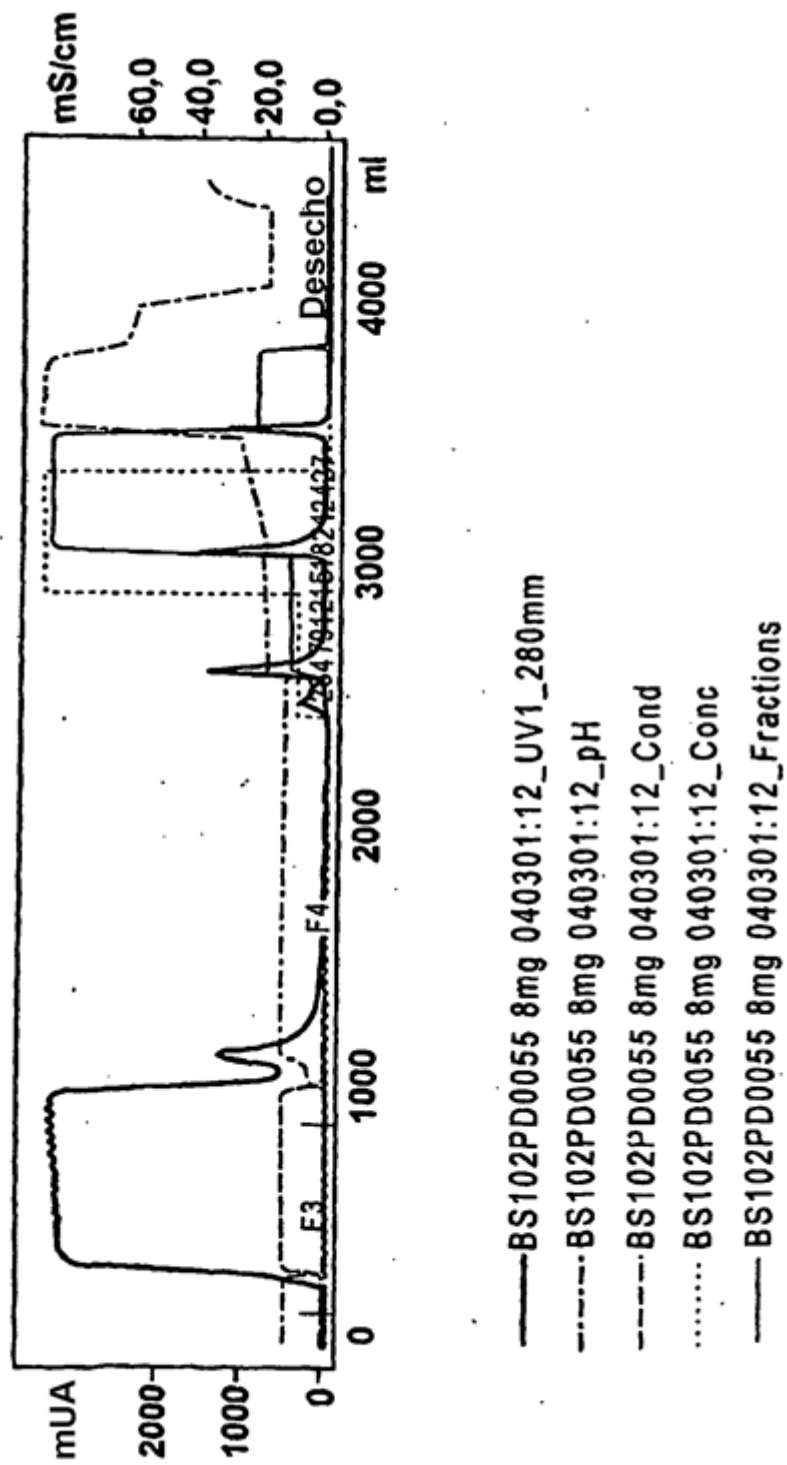


FIG. 8B

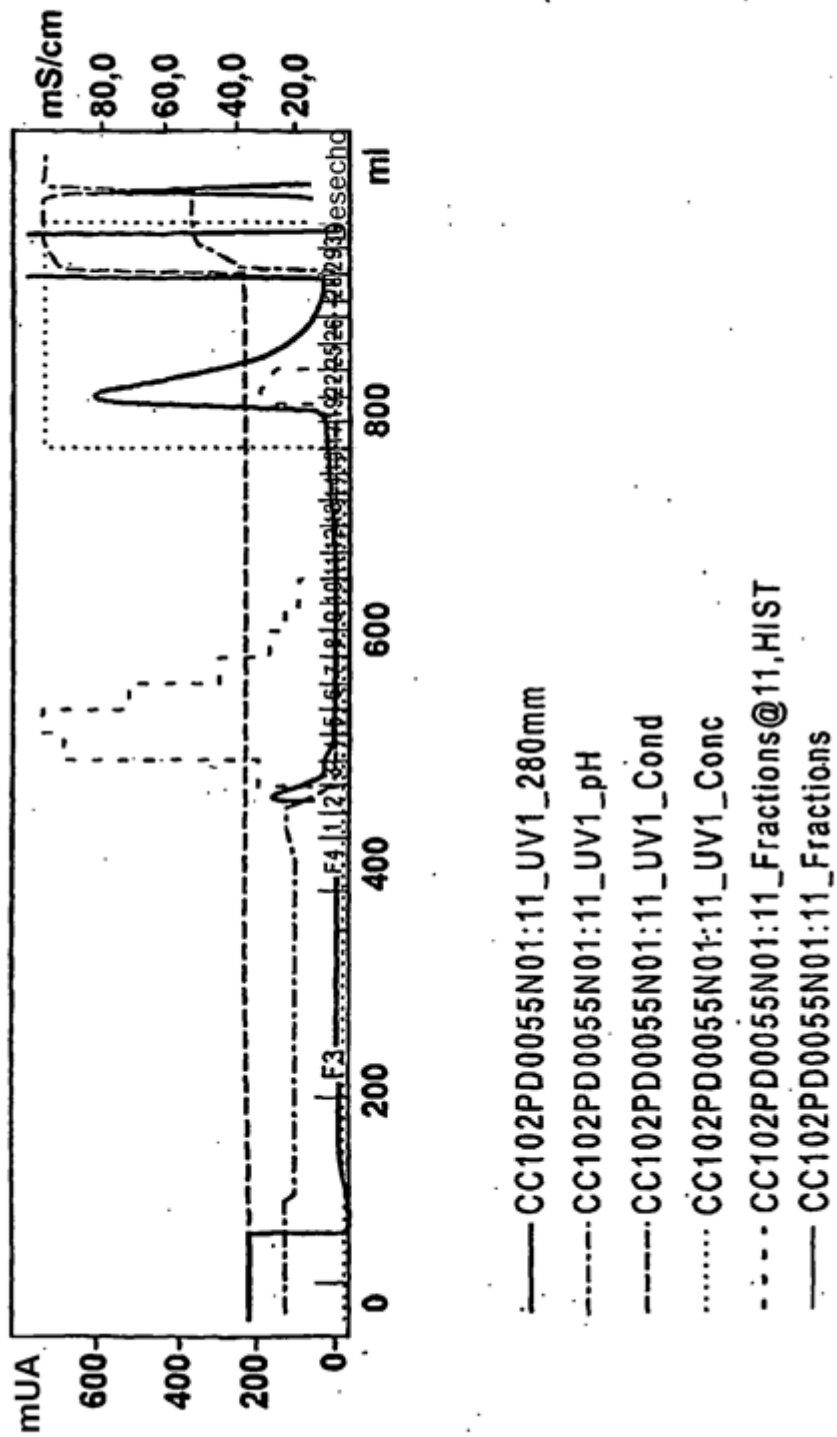


FIG. 8C

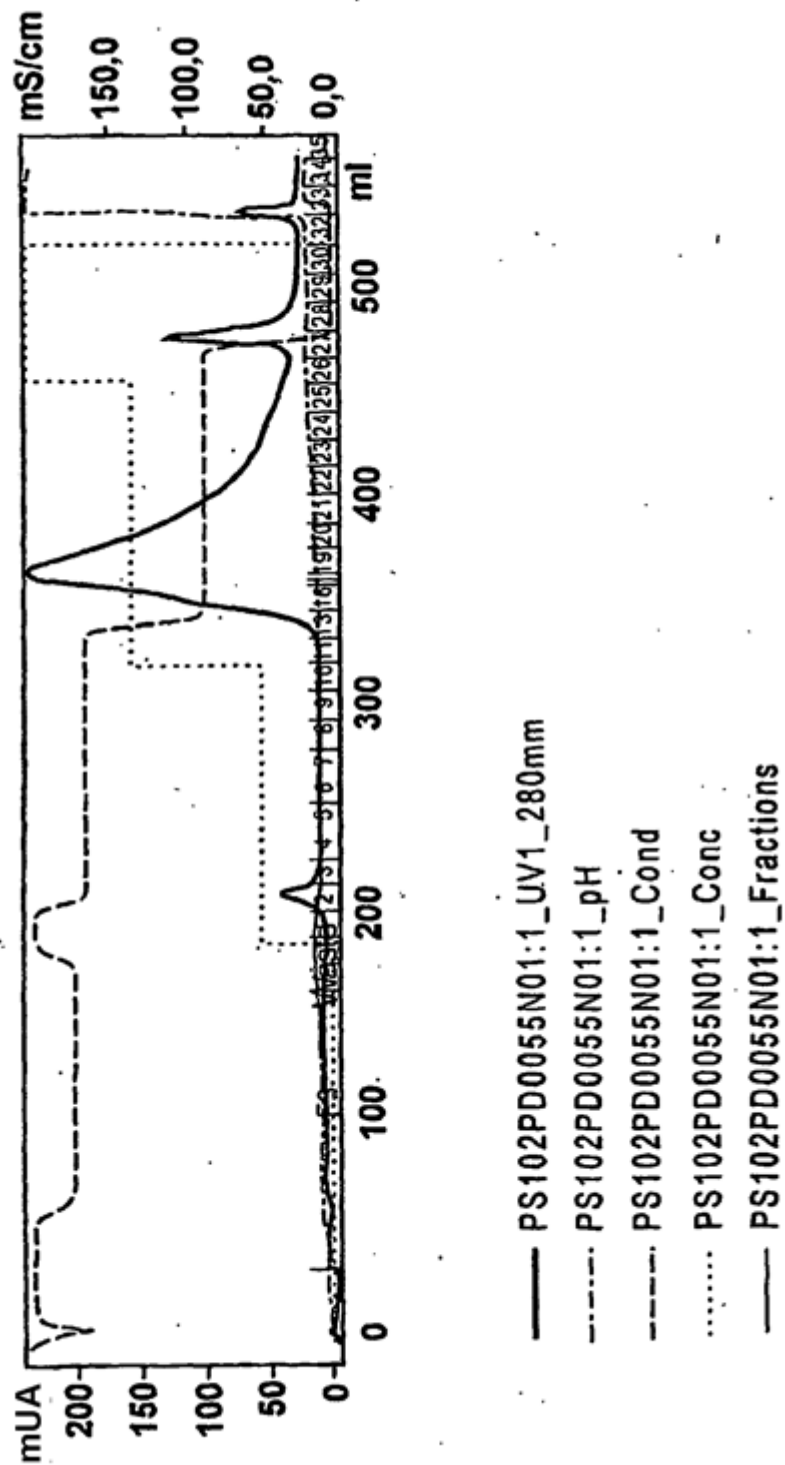
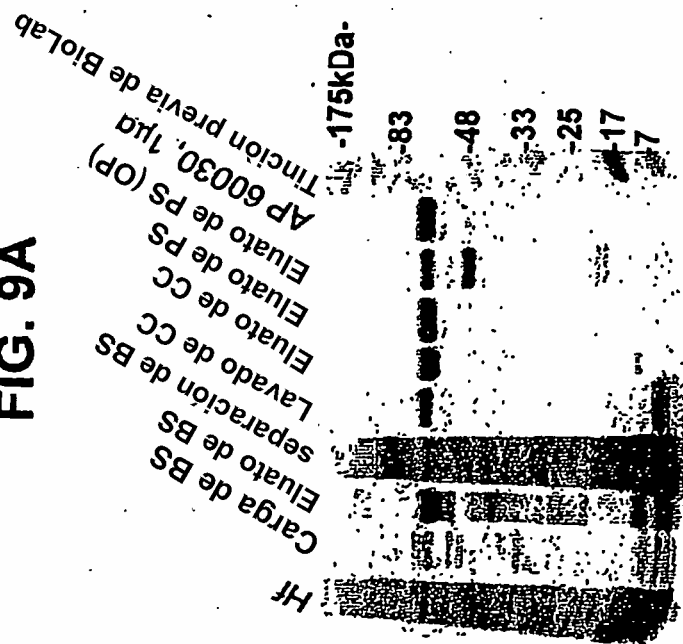
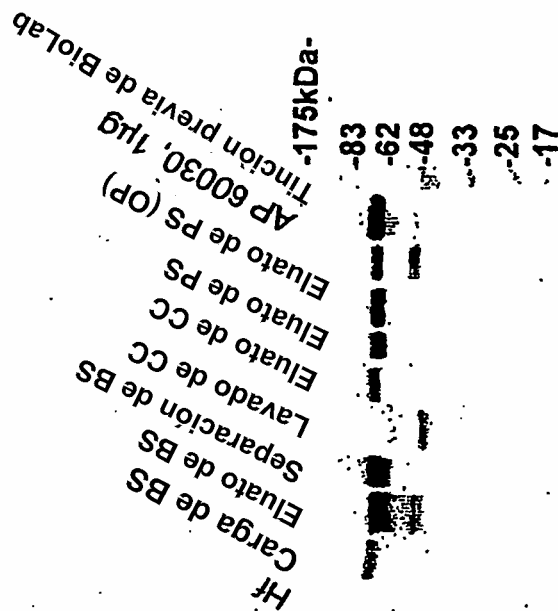


FIG. 9A



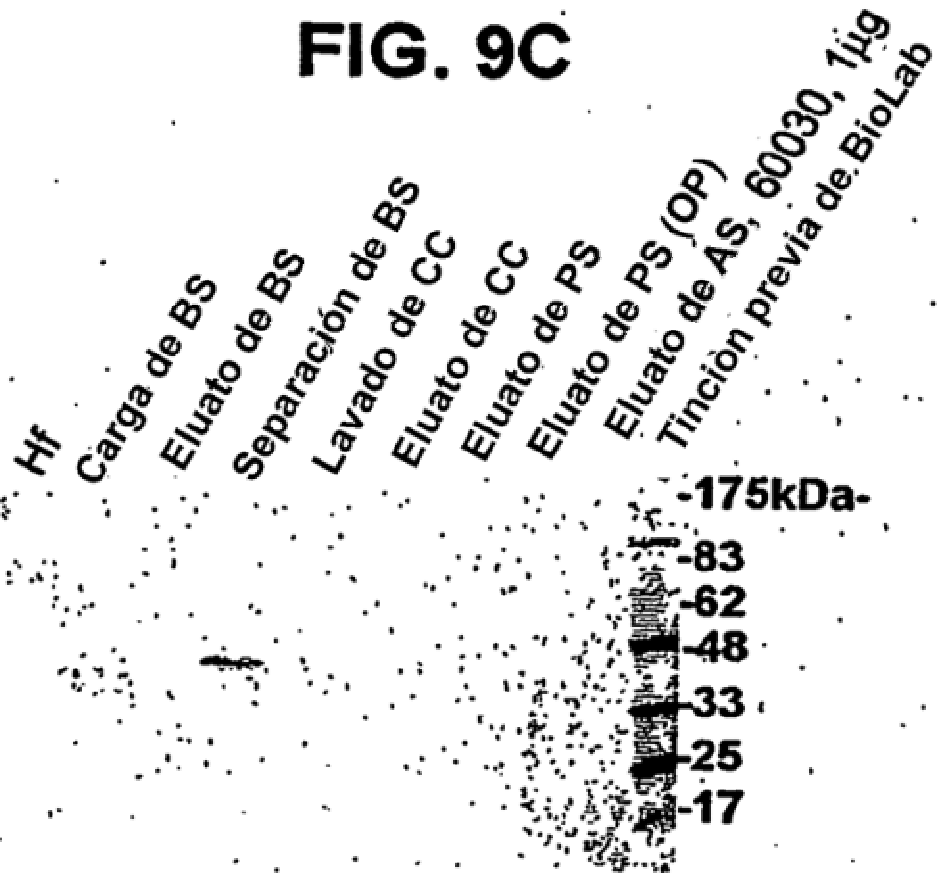
SDS-PAGE, gel de TG al 4-20%,
tinción de plata

FIG. 9B



Inmunotransferencia de tipo Western, anticuerpo anti-Asb, BP15 BL2. 1:5.000
Conjugado de IgG anti-conejo (H→L) -AP 1:3.000

FIG. 9C



Inmunotransferencia de tipo Western, IgG anti-cathepsina-G, M19, 1:5.000
IgG de asno anti-cabra AP 1:5.000

FIG. 10

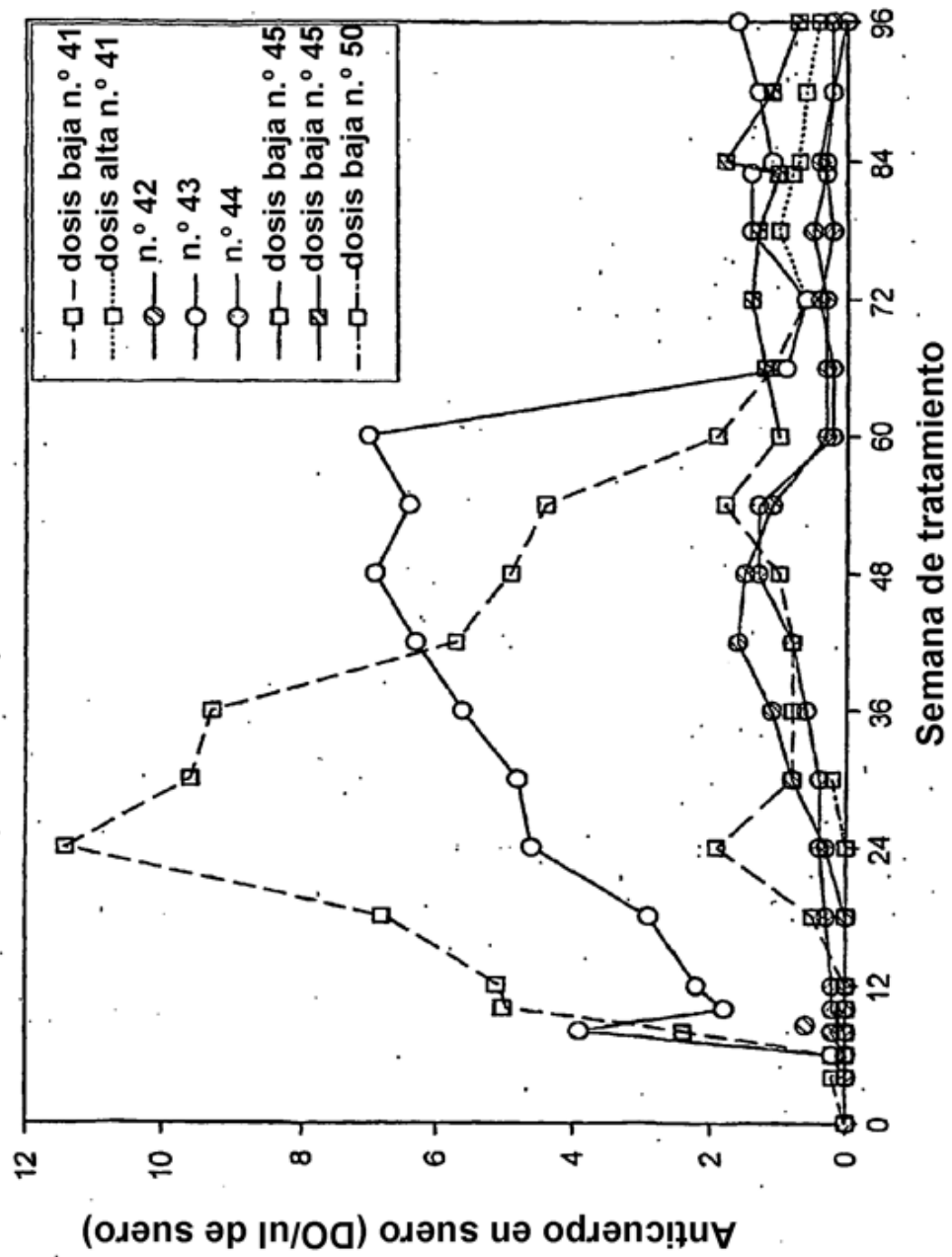


FIG. 11

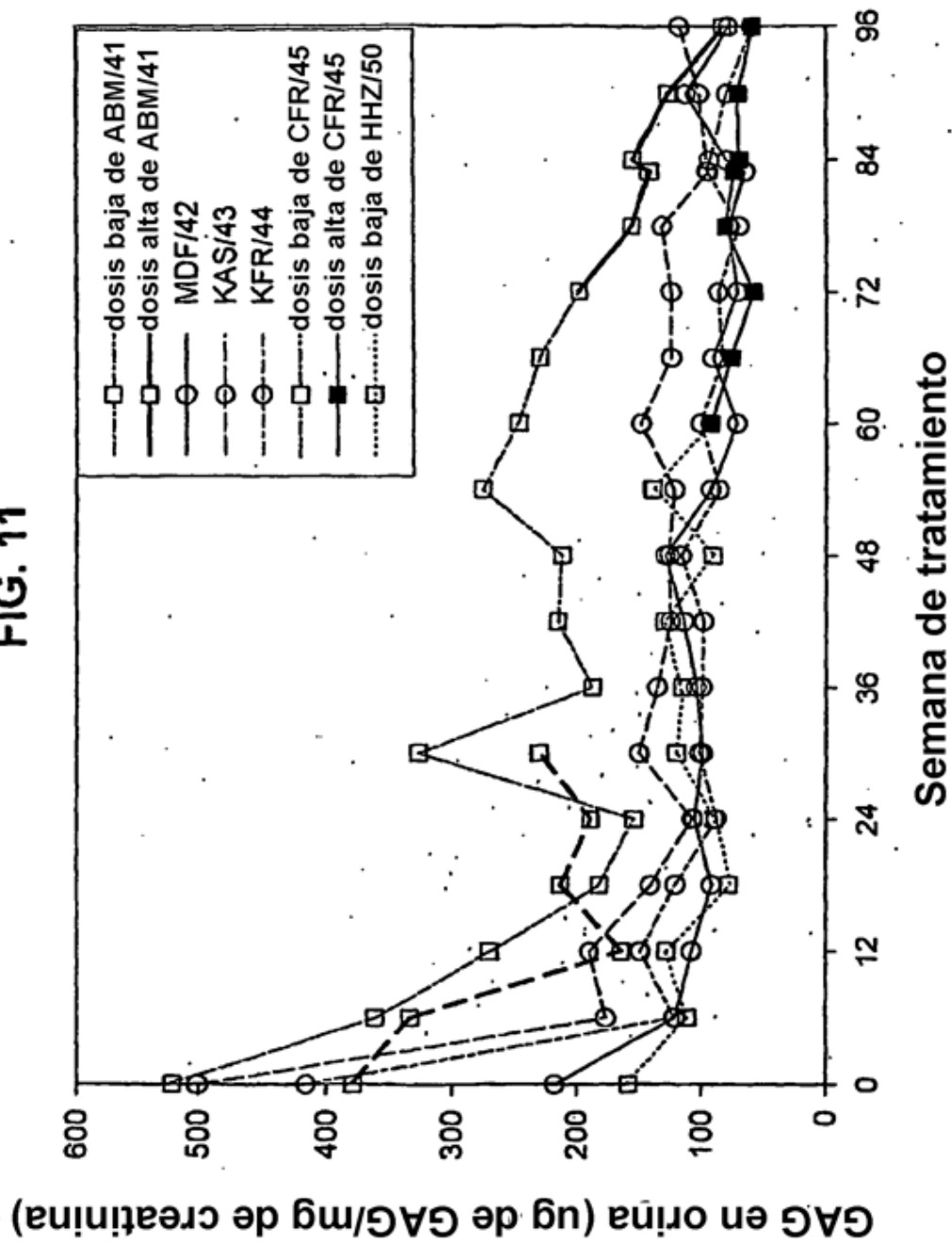


FIG. 12

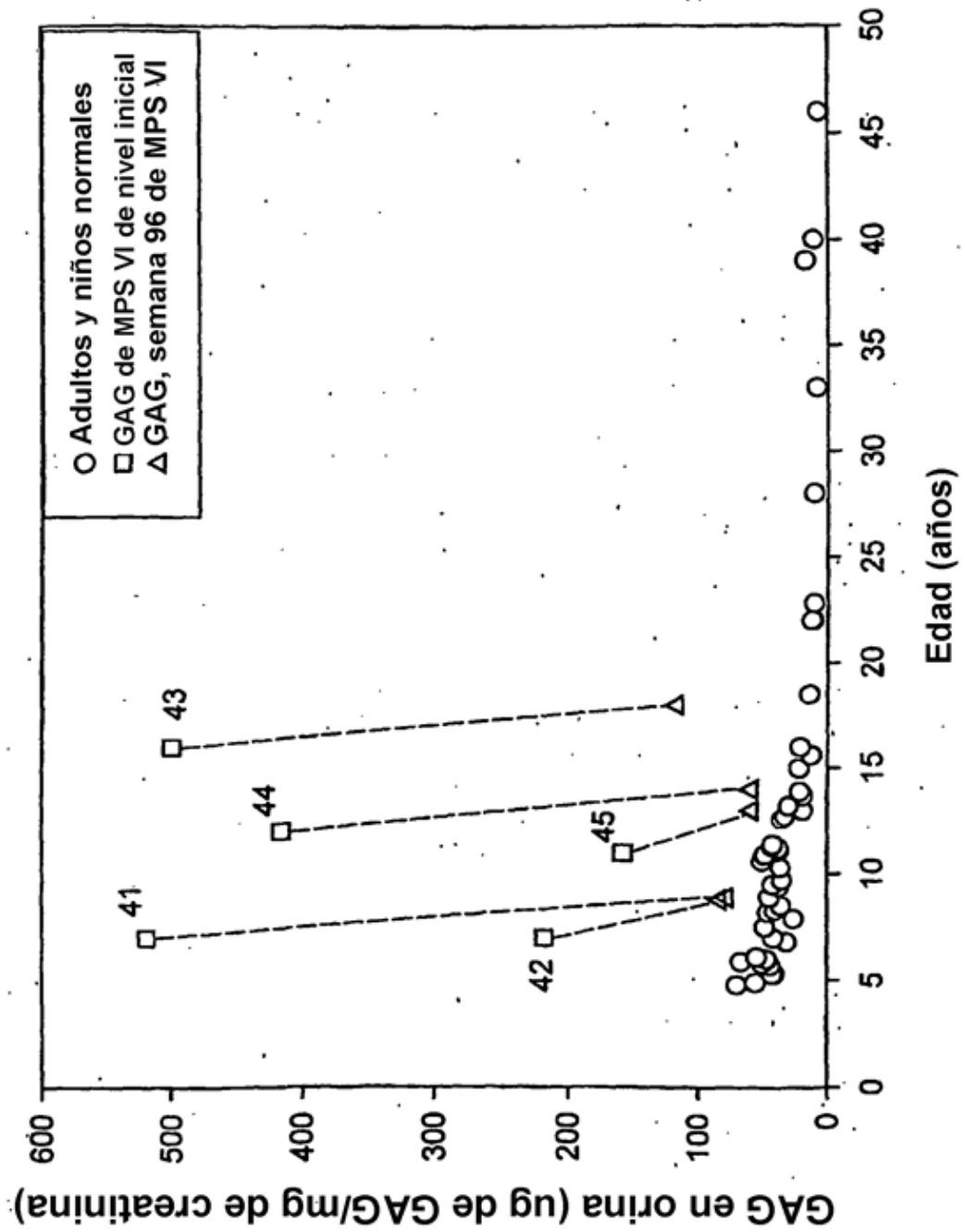


FIG. 13

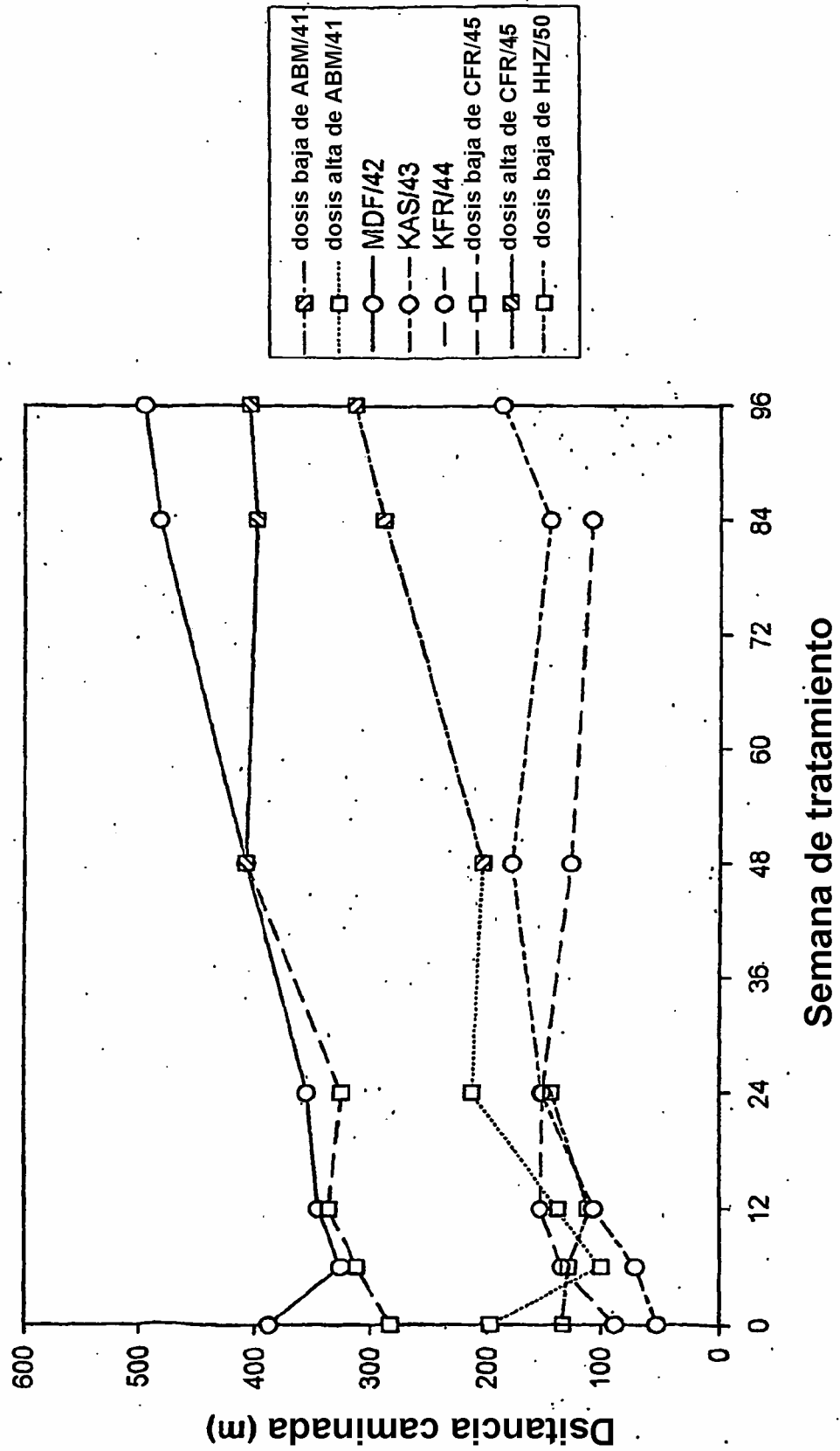


FIG. 14

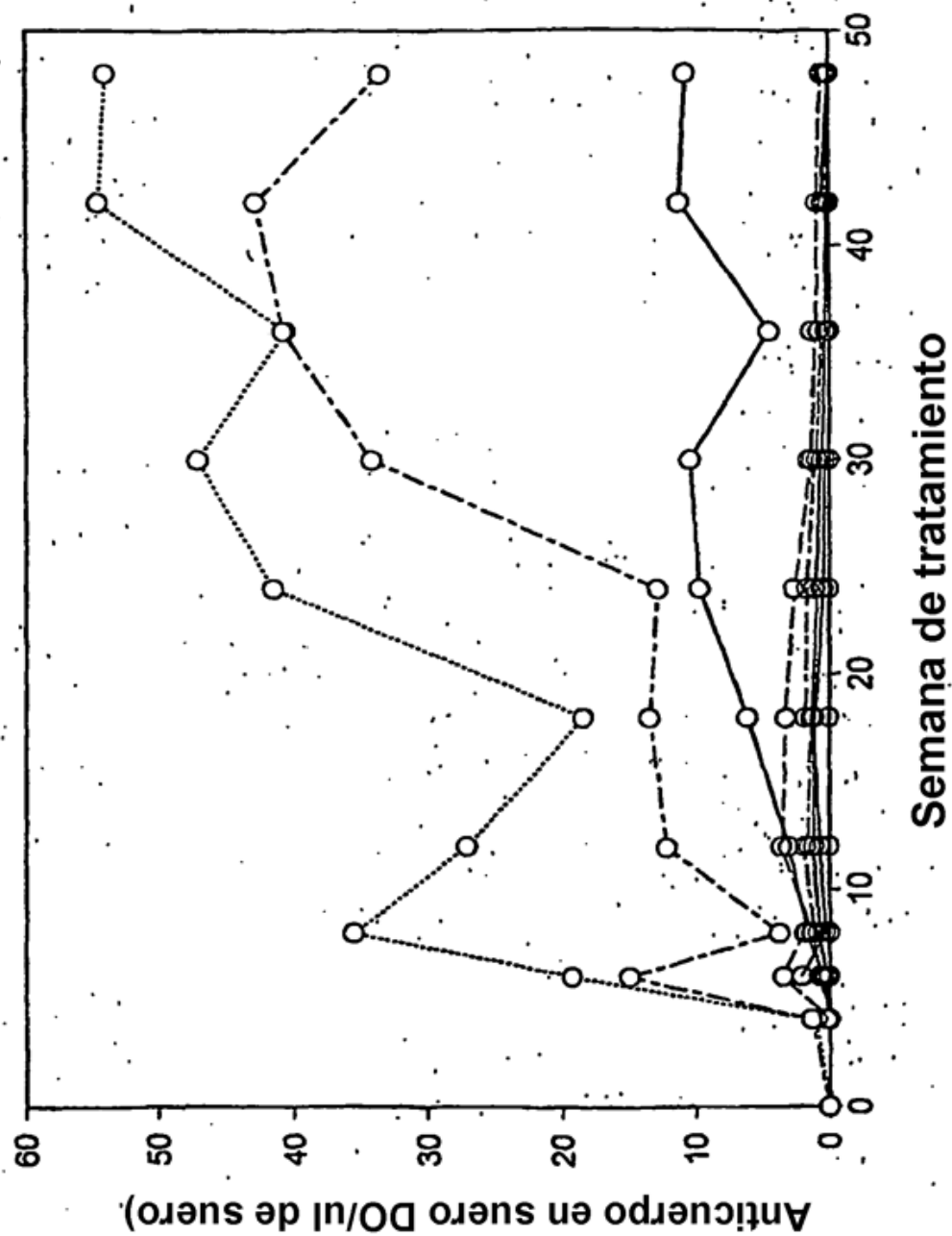


FIG. 15

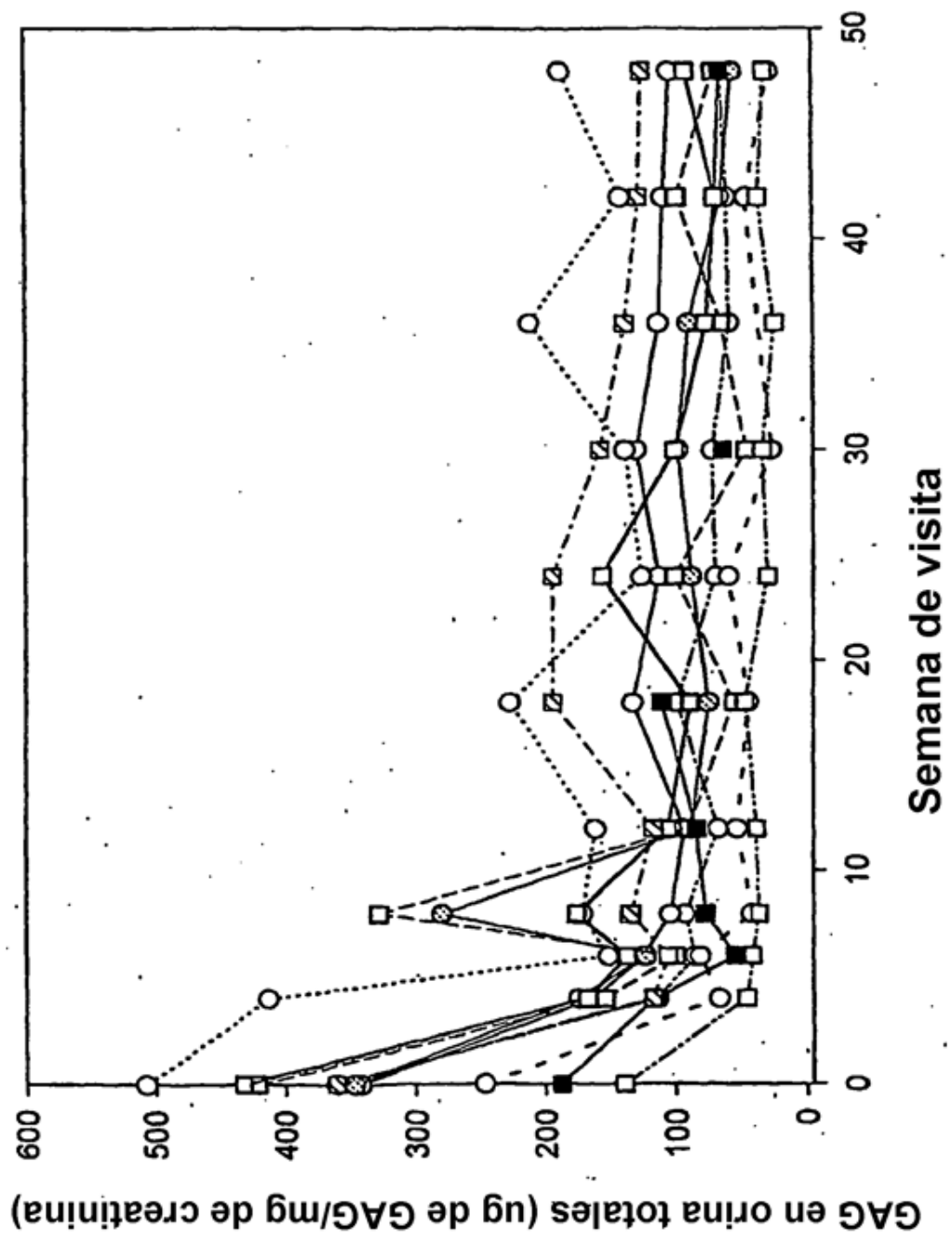


FIG. 16

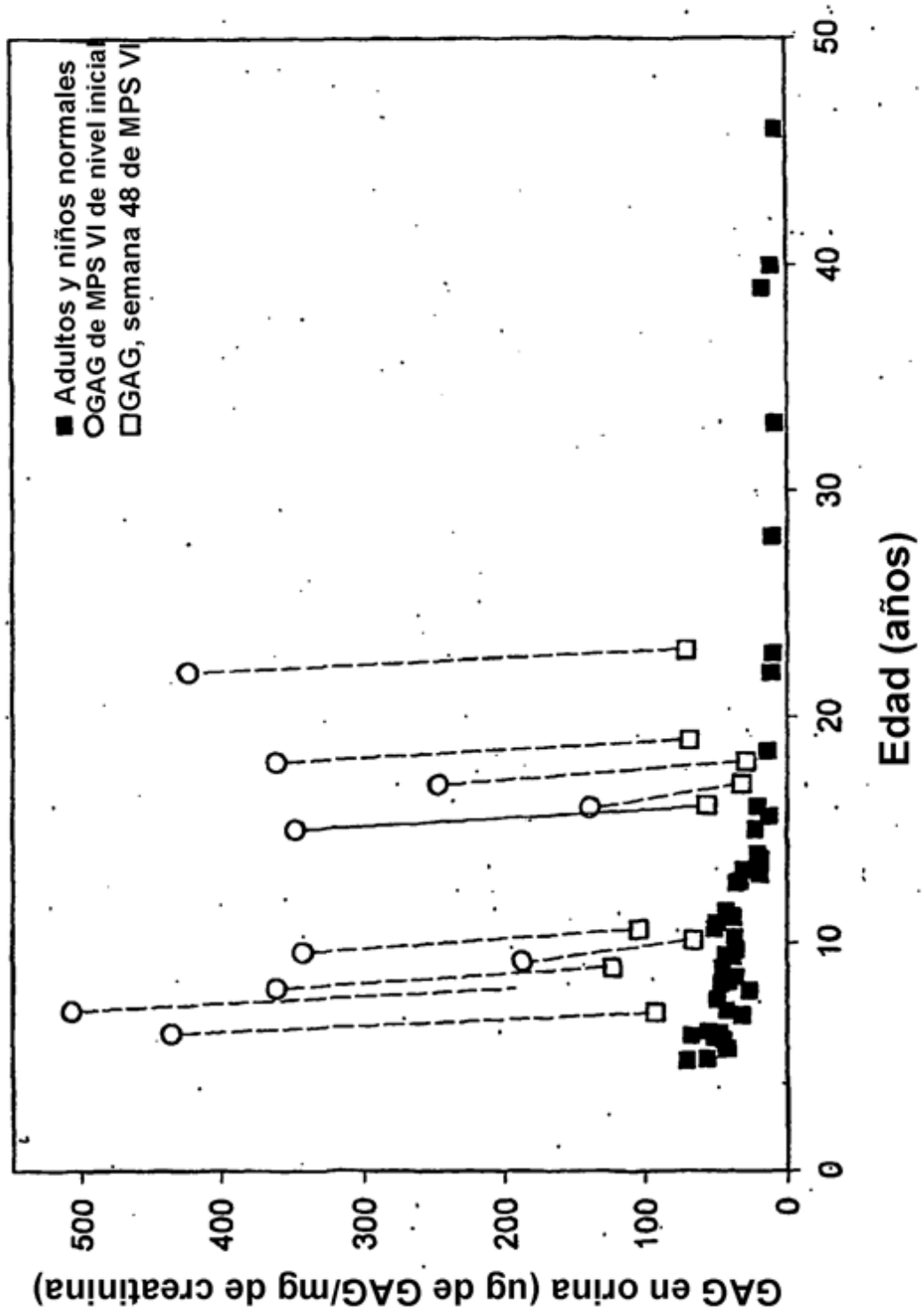


FIG. 17

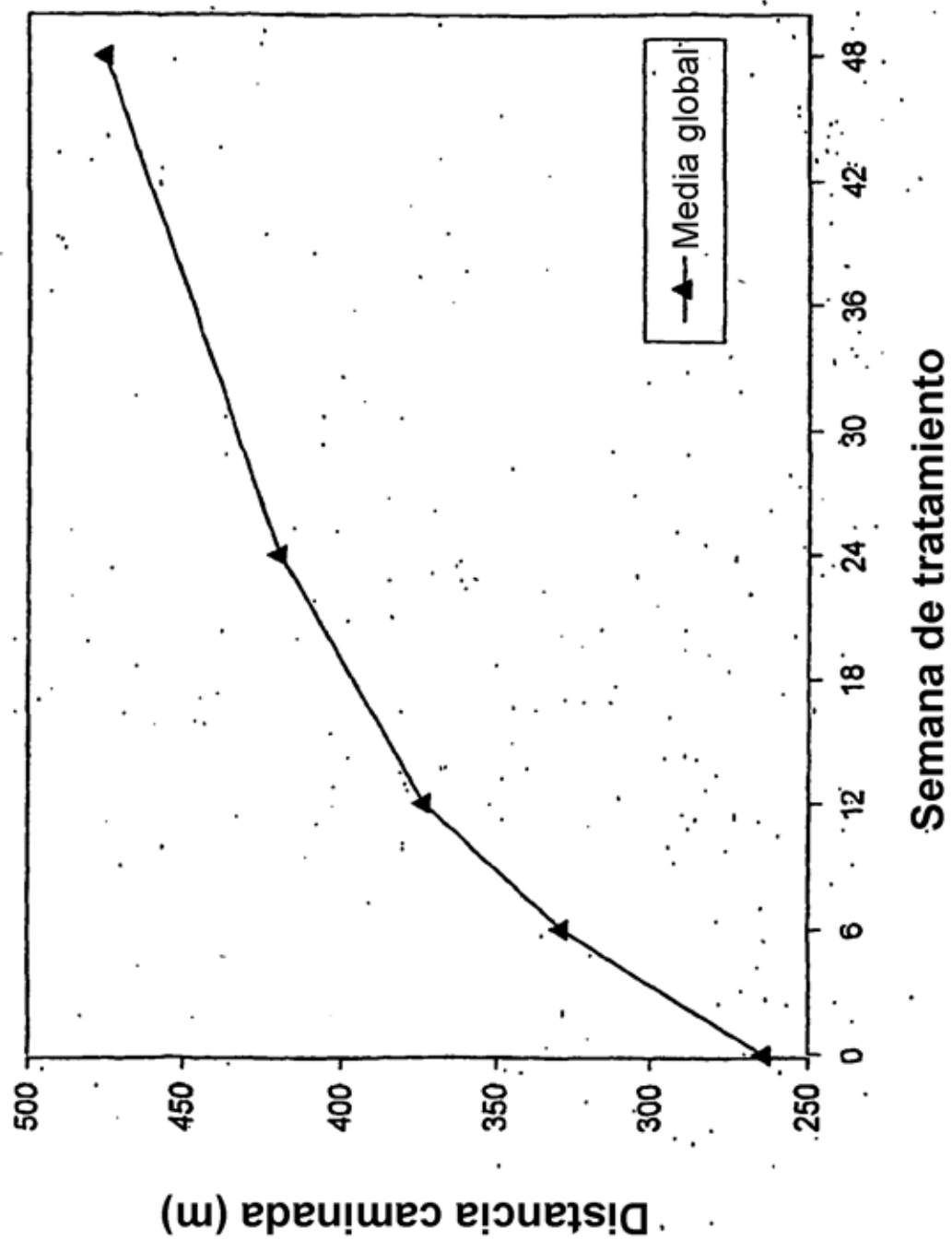


FIG. 18

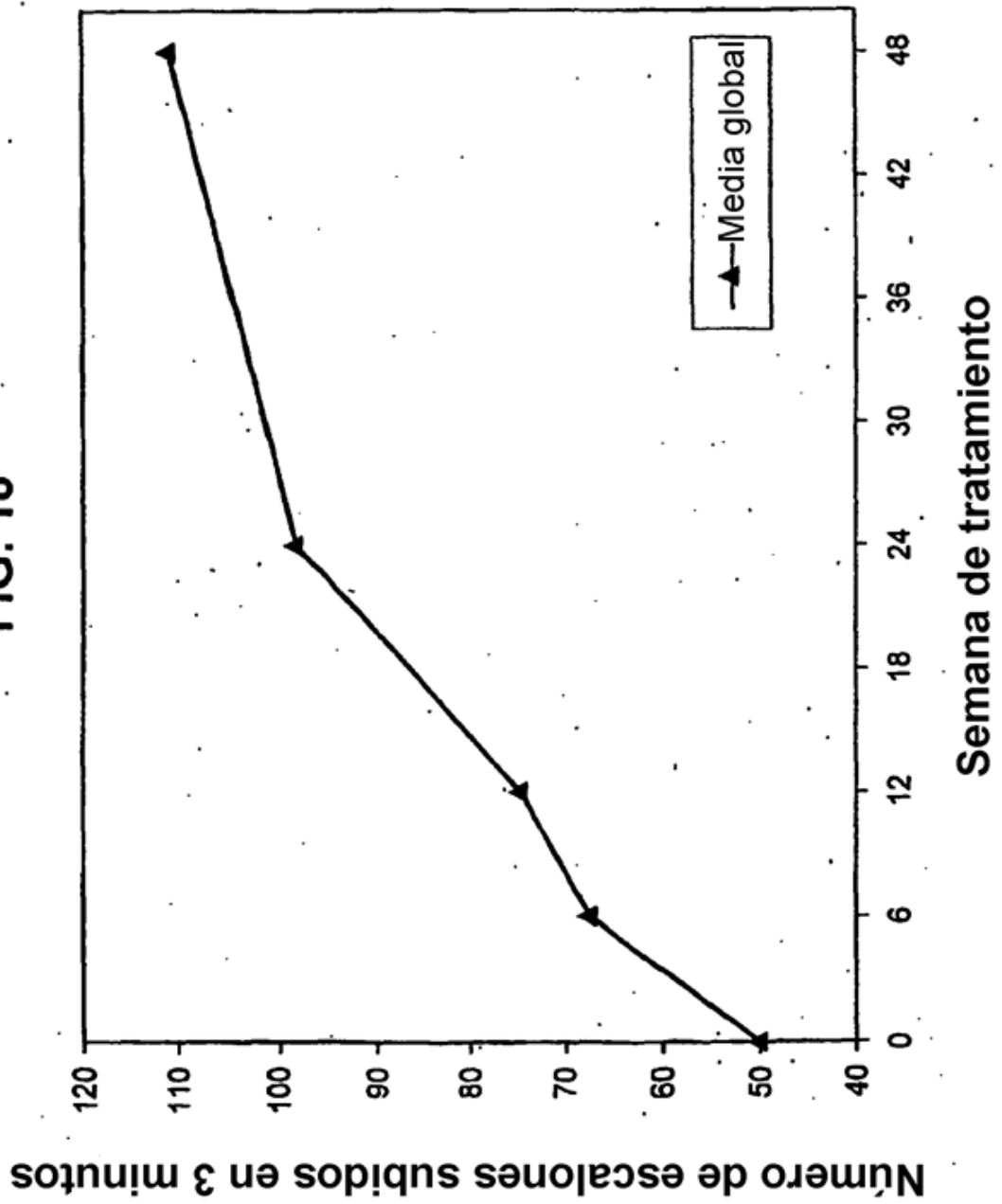


FIG. 19

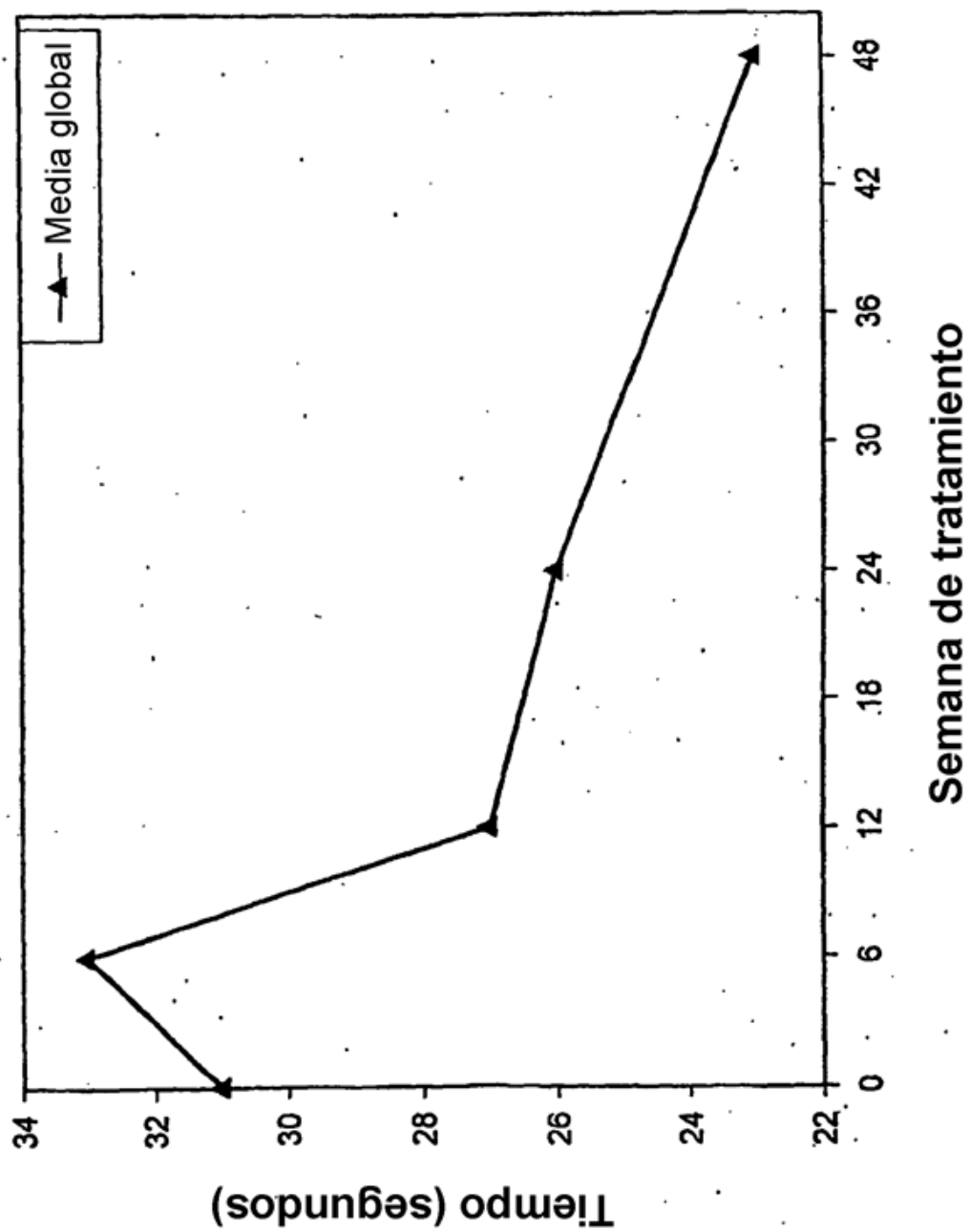


FIG. 20

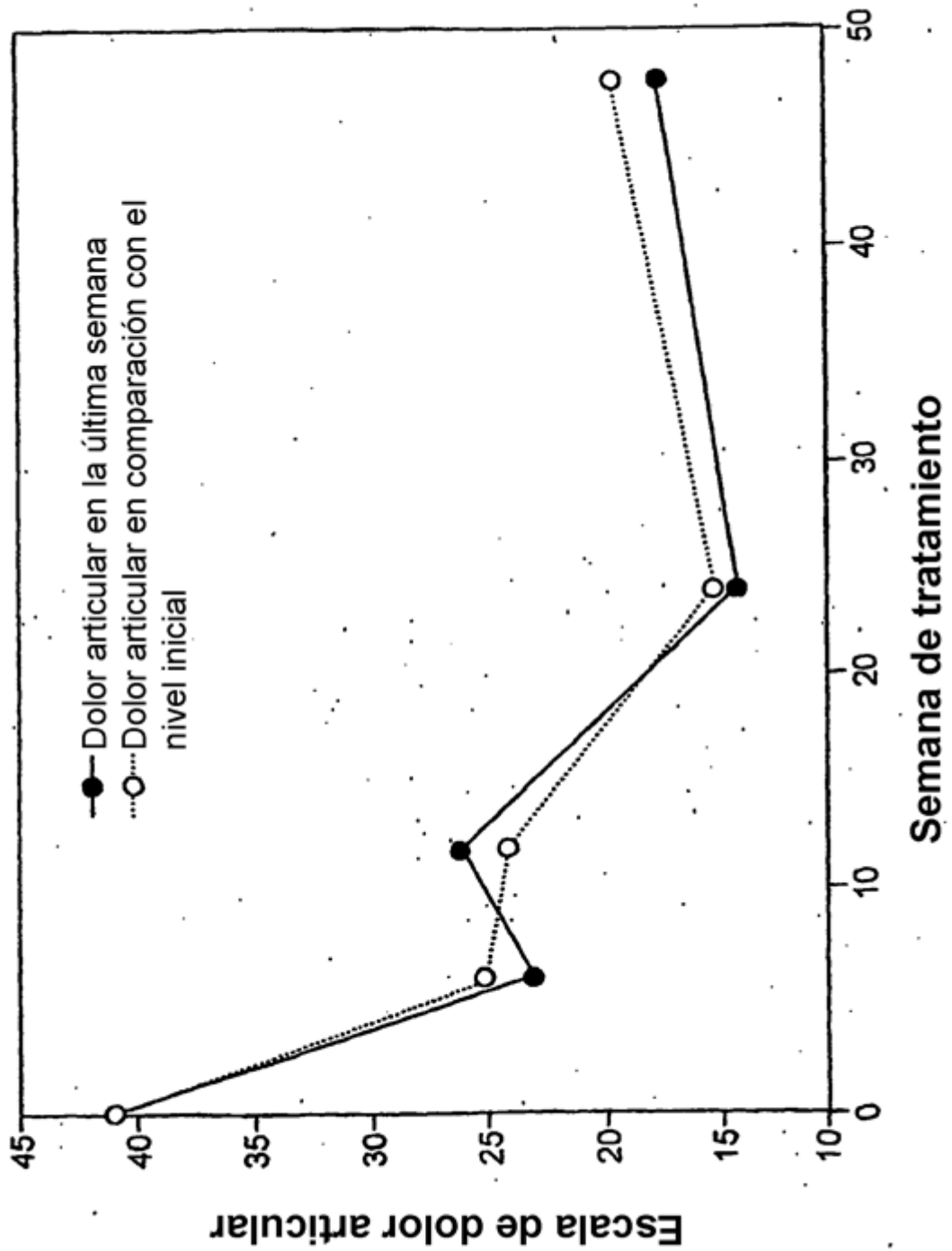


FIG. 21

