

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 478**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)

**C12N 9/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004 E 04707422 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1589993**

54 Título: **Terapia de combinación para tratar trastornos de deficiencia de proteínas**

30 Prioridad:

**31.01.2003 US 444136 P**

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

**16.03.2015**

73 Titular/es:

**THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF  
NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)  
ONE GUSTAVE L. LEVY PLACE  
NEW YORK, NY 10029, US**

72 Inventor/es:

**FAN, JIAN-QIANG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 531 478 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

Terapia de combinación para tratar trastornos de deficiencia de proteínas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/444.136, presentada el 31 enero de 2003, cuya descripción se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

Esta solicitud proporciona métodos para mejorar la estabilidad *in vitro* o aumentar la vida útil *in vitro* de una proteína recombinante purificada, al combinar la proteína con chaperonas específicas para el sitio activo (ASSC – siglas en inglés) para aumentar la estabilidad y la eficacia de la proteína que se esté administrando. La solicitud proporciona, además, composiciones que comprenden la proteína purificada y una ASSC.

10 **ANTECEDENTES****Deficiencia de proteínas**

Las proteínas se sintetizan intracelularmente de acuerdo con la secuencia de nucleótidos genómica de un gen particular a través de la transcripción, traducción, y otros procesos. La deficiencia de proteínas puede ser provocada por una mutación en el gen codificante, lo que resulta en (i) la no síntesis de la proteína; (ii) la síntesis de la proteína que carece de actividad biológica; o (iii) la síntesis de la proteína que contiene la actividad biológica normal o parcial, pero que no puede ser procesada apropiadamente para alcanzar el compartimiento nativo de la proteína. A los trastornos por deficiencia de proteínas que resultan de mutaciones genéticas también se les alude como trastornos genéticos.

Además de deficiencias de proteínas que resultan de mutaciones genéticas, algunas deficiencias de proteínas surgen debido a una enfermedad, o como un efecto secundario de un tratamiento de una enfermedad (p. ej., quimioterapia) o como resultado de una insuficiencia nutricional.

**Terapias actuales.** Hay numerosos trastornos que resultan de deficiencias de proteínas, algunos de los cuales surgen de proteínas mutadas y mal plegadas (trastornos conformacionales – véase *infra*). Una terapia actual para el tratamiento de deficiencias de proteínas es la terapia de reemplazo de proteínas, que implica típicamente la infusión intravenosa, subcutánea o intramuscular de una forma purificada de la correspondiente proteína de tipo salvaje, o la implantación de la proteína en una forma sólida bio-erosionable para la liberación prolongada. Una de las principales complicaciones con la terapia de reemplazo de proteínas es el logro y el mantenimiento de cantidades terapéuticamente eficaces de la proteína debido a la rápida degradación de la proteína infundida. El enfoque actual para superar este problema es llevar a cabo numerosas costosas infusiones de dosis alta.

La terapia de reemplazo de proteínas tiene varias advertencias adicionales tales como dificultades con la generación a gran escala, la purificación y el almacenamiento de proteínas adecuadamente plegadas, la obtención de proteína glicosilada nativa, la generación de una respuesta inmune anti-proteína y la incapacidad de la proteína de atravesar la barrera sangre-cerebro en enfermedades en las que esté significativamente implicado el sistema nervioso central.

La terapia génica utilizando vectores recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína funcional, o células humanas genéticamente modificadas que expresan una proteína funcional, también se está utilizando para tratar deficiencias de proteínas y otros trastornos que se benefician de la sustitución de proteínas. Aunque prometedora, este enfoque también está limitado por dificultades técnicas tales como la incapacidad de los vectores de infectar o transducir células en división, una baja expresión del gen diana y la regulación de la expresión una vez que se suministra el gen.

Un tercer enfoque, relativamente reciente, para el tratamiento de deficiencias de proteínas implica el uso de inhibidores de moléculas pequeñas para reducir el sustrato natural de las proteínas de enzima deficiente, mejorando de este modo la patología. Este enfoque de "privación de sustrato" ha sido descrito específicamente para una clase de aproximadamente 40 trastornos enzimáticos relacionados denominados trastornos de almacenamiento lisosomal o trastornos de almacenamiento glicoesfingolípido. Estos trastornos hereditarios se caracterizan por deficiencias en enzimas lisosomales que catalizan la descomposición de glicolípidos en las células, lo que resulta en una acumulación anormal de lípidos que interrumpe la función celular. Los inhibidores de moléculas pequeñas propuestos para su uso como terapia son específicos para la inhibición de las enzimas implicadas en la síntesis de glicolípidos, reduciendo la cantidad de glicolípidos celulares que necesita ser roto por la enzima deficiente. Este enfoque

también está limitado, debido a que los glicolípidos son necesarios para la función biológica, y una privación en exceso puede provocar efectos adversos. Específicamente, los glicolípidos son utilizados por el cerebro para enviar señales de los gangliosidos de neuronas a otro. Si hay demasiados pocos o demasiados glicolípidos, se ve impedida la capacidad de la neurona para enviar señales.

- 5 Un cuarto enfoque, comentado más adelante, como estrategia específica de chaperonas, rescata proteínas mutantes de la degradación en el retículo endoplasmático.

### **Procesamiento de Proteínas en el Retículo Endoplasmático**

10 Las proteínas se sintetizan en el citoplasma, y las proteínas recién sintetizadas se secretan en el lumen del retículo endoplasmático (ER - siglas en inglés) en un estado ampliamente sin plegar. En general, el plegamiento de proteínas se rige por el principio del auto-ensamblaje. Polipéptidos recién sintetizados se pliegan en su conformación nativa en base a sus secuencias de aminoácidos (Anfinsen et al., *Adv. Protein Chem.* 1975; 29: 205-300). *In vivo*, el plegamiento de proteínas es complicado, porque la combinación de temperatura ambiente y alta concentración de proteínas estimula el proceso de agregación en el que los aminoácidos normalmente enterrados en el núcleo hidrofóbico interactúan con sus vecinos de forma no específica. Para evitar este problema, el plegamiento de proteínas es generalmente facilitado por un grupo especial de proteínas llamadas chaperonas moleculares que impiden la agregación de las cadenas de polipéptido naciente, y se unen a la proteína desplegada de manera que las repliega en la conformación nativa (Hartl, *Nature* 1996; 381:571-580).

20 Las chaperonas moleculares están presentes en prácticamente todos los tipos de células y en la mayoría de los compartimientos celulares. Algunas están involucradas en el transporte de proteínas y permiten que las células sobrevivan en circunstancias de tensión tal como un choque térmico y la inanición de glucosa (Gething et al., *Nature* 1992; 355:33-45; Caplan, *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 262-268; Lin et al., *Mol. Biol. Cell.* 1993; 4:109-1119; Bergeron et al., *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19:124-128). Entre las chaperonas moleculares, Bip (proteína de unión a inmunoglobulina de cadena pesada, Grp78) es la chaperona mejor caracterizada del ER (Haas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991; 167:71-82). Al igual que otras chaperonas moleculares, Bip interactúa con muchas proteínas secretoras y de la membrana dentro del ER durante su maduración, aunque la interacción es normalmente débil y de corta duración cuando el plegado discurre con fluidez. Una vez que se logra la conformación de la proteína nativa, la chaperona molecular ya no interactúa con la proteína. La unión de Bip a una proteína que fracasa en el plegamiento, ensamblaje o en la glicosilación adecuada, se vuelve estable, y conduce a la degradación de la proteína a través de la vía de degradación asociada a ER. Este proceso sirve como un sistema de "control de calidad" en el ER, lo que garantiza que sólo las proteínas correctamente plegadas y ensambladas sean transportadas fuera del ER para su posterior maduración, y las proteínas plegadas incorrectamente se conservan para su posterior degradación (Hurtley et al., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1989; 5:277-307).

35 Determinadas mutaciones en el ADN resultan en sustituciones de aminoácidos que impiden adicionalmente, y en muchos casos se oponen, al plegamiento correcto de las proteínas mutantes. Para corregir estos plegamientos erróneos, los investigadores han intentado utilizar diversas moléculas. Las altas concentraciones de glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), trimetilamina-N-óxido (TMAO), o agua deuterada han demostrado suprimir la vía de degradación y aumentar el tráfico intracelular de la proteína mutante en varias enfermedades (Brown et al., *Cell Stress Chaperones* 1996; 1:117-125; Burrows et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:1796-801). Estos compuestos se consideran chaperones químicos no específicos para mejorar el plegamiento de proteínas en general, aunque el mecanismo de la función es aún desconocido. Las altas dosis de esta clase de compuestos requeridas para la eficacia les hace difícil o inapropiados de utilizar clínicamente, aunque son útiles para el examen bioquímico del defecto de plegamiento de una proteína intracelularmente. Estos compuestos también carecen de especificidad.

### **Estrategia Específica de las Chaperonas**

45 Patentes y publicaciones anteriores describen una estrategia terapéutica para el rescate de las proteínas enzimáticas endógenas, enzimas lisosomales específicamente mal plegadas, de la degradación por la maquinaria de control de calidad del ER. Esta estrategia emplea inhibidores competitivos reversibles de moléculas pequeñas, específicos para una enzima lisosomal defectuosa asociada con un trastorno lisosomal particular. La estrategia es la siguiente: dado que la proteína enzima mutante se pliega incorrectamente en el ER (Ishii et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática es retardada en la vía de transporte normal (ER → aparato de Golgi → endosoma → lisosoma) y es degradada rápidamente. Por lo tanto, un compuesto funcional que facilita el correcto plegamiento de una proteína mutante servirá como una chaperona específica para el sitio para que la proteína mutante fomente el escape suave desde el sistema de control de calidad del ER. Dado que se sabe que algunos inhibidores de una enzima ocupan el centro catalítico de la enzima, resultando en la estabilización de su

conformación *in vitro*. Estas chaperonas específicas pueden ser designadas chaperonas específicas para el sitio activo (ASSC).

La estrategia se ha demostrado específicamente para enzimas implicadas en los trastornos de almacenamiento lisosomal en las Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 6.274.597, 6.583.158, 6.589.964 y 6.599.919, expedidas a Fan et al., y en la Solicitud de EE.UU. N<sup>o</sup> de Serie 10/304.396 presentada el 26 de noviembre 2002. Por ejemplo, un derivado de galactosa de molécula pequeña, 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), un potente inhibidor competitivo de la enzima mutante Fabry  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A), aumentó eficazmente la estabilidad *in vitro* de una  $\alpha$ -Gal A mutante (R301Q) a pH neutro y potenció la actividad de la enzima mutante en linfoblastos establecidos de pacientes con Fabry con mutaciones R301Q o Q279E. Además, la administración oral de DGJ a ratones transgénicos que sobre-expresan una  $\alpha$ -Gal A mutante (R301 Q) elevó sustancialmente la actividad de la enzima en los órganos principales (Fan et al., Nature Med. 1999; 5:112-115). El rescate con éxito de una proteína plegada de forma incorrecta depende de la consecución de una concentración del inhibidor específico *in vivo* que es menor que la necesaria para inhibir completamente la enzima, en contraposición con el enfoque de la privación de sustrato en el que se requieren concentraciones inhibitoras de la enzima.

Además de los trastornos de almacenamiento lisosomal, ahora se reconoce un número grande y diverso de enfermedades como enfermedades conformacionales que son causadas por la adopción de conformaciones no nativas de las proteínas, que pueden conducir al retraso de la proteína en el ER y, en última instancia, a la degradación de las proteínas (Kuznetsov et al., N. Engl. J. Med. 1998; 339: 1688-1695; Thomas et al., Trends Biochem. Sci. 1995; 20: 456-459; Bychkova et al., FEBS Lett. 1995; 359: 6-8; Brooks, FEBS Lett. 1997; 409:115-120). Las ASSCs han demostrado rescatar la expresión de proteínas mutantes con excepción de enzimas. Por ejemplo, se encontró que pequeños compuestos sintéticos estabilizan el dominio de unión a ADN de las formas mutantes de la proteína p53 supresora de tumores, permitiendo de este modo que la proteína mantenga una conformación activa (Foster et al, Science 1999; 286: 2507-10). La síntesis de los receptores ha demostrado ser rescatada por antagonistas de receptores y ligandos de moléculas pequeñas (Morello et al., J. Clin. Invest. 2000; 105: 887-95; Petaja-Repo et al. , EMBO J. 2002; 21: 1628-37). Incluso se ha demostrado el rescate farmacológico de proteínas de los canales de membrana y otros transportadores de membrana de plasma utilizando fármacos o sustratos bloqueantes de los canales (Rajamani et al., Circulation 2002; 105: 2830-5; Zhou et al, J. Biol. Chem. 1999; 274: 31123-26; Loo et al., J. Biol. Chem 1997; 272: 709-12). Todas las referencias anteriores indican que las ASSCs son capaces de un rescate específico de proteínas mutantes, que incluyen, pero no se limitan a, enzimas, receptores, proteínas de los canales de membrana, y factores de transcripción de ADN.

Además de las proteínas mutantes, las ASSCs también han demostrado estabilizar las proteínas de tipo salvaje, lo que resulta en su producción y estabilidad mejoradas. Como un ejemplo, se ha demostrado que una ASSC específica, DGJ, es capaz de aumentar la cantidad y la actividad de  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje en células COS-7 transfectadas con un vector que codifica la secuencia de  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje. La ASSC rescata la enzima de tipo salvaje sobre-expresada, que es de otro modo retardada en el sistema de control de calidad del ER, debido a que la sobre-expresión y la sobre-producción de la enzima en las células COS-7 excede la capacidad del sistema y conduce a la agregación y la degradación (véase la solicitud de EE.UU. N<sup>o</sup> de Serie 10/377.179, presentada el 28/02/03).

En resumen, existe una necesidad en la técnica de métodos para mejorar la eficacia biológica y la eficacia del costo de la terapia de reemplazo de proteínas tales como para el tratamiento de deficiencias de proteínas u otros trastornos, con lo cual se administran proteínas de recambio.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método para mejorar la estabilidad *in vitro* o para aumentar la vida útil *in vitro* de una  $\alpha$ -galactosidasa A de tipo salvaje humana recombinante purificada en una formulación que tiene un pH entre 7,0 y 7,5 para la administración parenteral a un ser humano, poniendo en contacto la  $\alpha$ -galactosidasa A en un soporte farmacéuticamente aceptable con 1-desoxigalactonojirimicina en una cantidad eficaz para aumentar la estabilidad *in vitro* o para aumentar la vida útil de la  $\alpha$ -galactosidasa A purificada, en donde la  $\alpha$ -galactosidasa A no es una  $\alpha$ -galactosidasa A mutante que esté incorrectamente plegada en una conformación biológicamente inactiva.

La proteína en el soporte farmacéuticamente aceptable puede estar liofilizada o puede ser una disolución acuosa.

En una realización preferida, la  $\alpha$ -galactosidasa A está asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal.

En una realización, el trastorno de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Fabry.

La invención proporciona, además, una composición que comprende una  $\alpha$ -galactosidasa A de tipo salvaje humana recombinante purificada y 1-desoxigalactonojirimicina en un soporte farmacéuticamente aceptable.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

5 La **Figura 1** demuestra la estabilidad mejorada tanto de  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje purificada a partir de medio de cultivo de células Sf-9 infectadas con baculovirus recombinantes que portan ADNc de  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje humano, una  $\alpha$ -Gal A mutante recogida en forma de homogeneizados de corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan  $\alpha$ -Gal A humana mutante (R301Q), respectivamente, utilizando una chaperona específica para el sitio 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ, 1  $\mu$ M). Los ratones fueron tratados con DGJ 0,5 mM como agua potable durante una semana antes del experimento. Las enzimas mutante (A) y de tipo salvaje (B) se pre-incubaron con tampón de citrato-fosfato 0,1 M (pH 7,0) a 37°C para la enzima mutante y a 42°C para la enzima de tipo salvaje, respectivamente, en presencia de DGJ a una concentración de 1  $\mu$ M (o), 0,1  $\mu$ M (●), 0,03  $\mu$ M (◆) o 0  $\mu$ M (sin DGJ; ◇). La actividad enzimática se reseña en relación con la enzima sin pre-incubación. DGJ puede servir como un estabilizador para evitar la desnaturalización/degradación de las enzimas mutantes y de tipo salvaje.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

15 La presente invención mejora ventajosamente la eficacia de la terapia de reemplazo de proteínas para el tratamiento de enfermedades o trastornos, poniendo en contacto la proteína con una chaperona específica para el sitio activo (ASSC). Las ventajas de la invención proceden de (a) eficacia incrementada de la producción de proteínas a partir de células de animales no mamíferos; (b) estabilidad incrementada de la proteína terapéutica, que se manifiesta por una mayor vida útil y una mejor semivida y actividad *in vivo*; (c) el mantenimiento de la estructura del sitio activo de la proteína durante translocaciones *in vivo*, incluidas a través de las membranas celulares; y (d) el rescate de la proteína mutante endógena que es incorrectamente plegada durante la síntesis y, en consecuencia, se aclaró del retículo endoplasmático.

La presente invención proporciona, además, formulaciones que comprenden la proteína activa y la chaperona específica para el sitio activo (ASSC) específicas para la estabilización de la proteína.

25 La invención se basa en el descubrimiento de que las ASSCs se pueden utilizar como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo de proteínas para el tratamiento de trastornos genéticos y otros. Las ASSCs se pueden rastrear e identificar utilizando métodos conocidos en la técnica. Una vez que se identifica una ASSC específica, útil para un trastorno particular, la ASSC se puede administrar a un paciente que recibe una terapia de reemplazo de proteínas para mejorar la absorción de la proteína de reemplazo en el compartimiento celular apropiado, mejorar la estabilidad de la proteína en la circulación y, si es necesario, durante transporte en la célula. La chaperona puede estabilizar la proteína en su forma activa durante la fabricación, almacenamiento y uso *in vivo*.

### **Definiciones**

Los términos y expresiones utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en donde se utiliza cada uno de los términos y expresiones. Determinados términos y expresiones se discuten a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al practicante en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y cómo hacerlos y utilizarlos.

40 **Definiciones Específicas.** La expresión "sustitución de proteína" se refiere a la introducción de una proteína no nativa, purificada, en un individuo que tiene una deficiencia en dicha proteína. La proteína administrada puede obtenerse a partir de fuentes naturales (tales como gamma-globulina humana para el tratamiento de RSV o mononucleosis) o por expresión recombinante (como se describe en mayor detalle a continuación). La expresión también se refiere a la introducción de una proteína purificada en un individuo que requiera de otra manera o que se beneficie de la administración de una proteína purificada, p. ej., que padezca insuficiencia de proteínas. La proteína introducida puede ser una proteína purificada, recombinante, producida *in vitro*, o una proteína purificada a partir de tejido aislado o fluido tal como, p. ej., placenta o la leche de los animales, o de plantas.

La expresión "trastorno caracterizado por una deficiencia de proteínas" se refiere a cualquier trastorno que se presente una patología provocada por cantidades ausentes o insuficientes de una proteína. Esta expresión engloba trastornos de plegamiento de proteínas, es decir, trastornos conformacionales, que dan como resultado un producto de proteína biológicamente inactivo. La insuficiencia de proteínas puede estar implicada en enfermedades infecciosas, inmunosupresión, insuficiencia de órganos, problemas glandulares, enfermedad por radiación, deficiencia nutricional, envenenamiento u otras agresiones medioambientales o externas.

La expresión "estabilizar una conformación adecuada" se refiere a la capacidad de un compuesto o péptido u otra molécula de asociarse con una proteína de tipo salvaje, o a una proteína mutante que puede realizar su función de tipo salvaje *in vitro*, p. ej., en una formulación, e *in vivo*, de tal manera que la estructura de la proteína de tipo salvaje o mutante se puede mantener como su forma nativa o adecuada. Este efecto puede manifestarse por sí mismo

5 prácticamente a través de uno o más de (i) vida útil incrementada de la proteína; (ii) mayor actividad por unidad/cantidad de proteína; o (iii) una mayor eficacia *in vivo*. Se puede observar experimentalmente a través de un rendimiento incrementado a partir del ER durante la expresión; mayor resistencia a un desplegamiento debido a los aumentos de temperatura, o la presencia de agentes caotrópicos, y por medios similares.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "trastorno conformacional" o "enfermedad conformacional" se refiere a un trastorno que es provocado por la adopción de una conformación de la proteína que no es normalmente formada por una proteína de tipo salvaje en un estado nativo con la actividad biológica normal, lo que puede conducir al retraso y la destrucción de una proteína en el ER. El nivel de proteína reducido resulta en un desequilibrio fisiológico que se manifiesta por sí mismo como una enfermedad o trastorno. En una realización

10 específica, el trastorno conformacional es un trastorno de almacenamiento lisosomal.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sitio activo" se refiere a la región de una proteína que tiene una cierta actividad biológica específica. Por ejemplo, puede ser un sitio que se une a un sustrato u otro participante en la unión y contribuye los residuos de aminoácidos que participan directamente en la formación y ruptura de enlaces químicos. Sitios activos en esta invención pueden abarcar sitios catalíticos de enzimas, sitios de unión a antígeno de anticuerpos, dominios de unión a ligandos de receptores, dominios de unión de reguladores o dominios de unión a

15 receptores de proteínas secretadas. Los sitios activos también pueden abarcar la transactivación, la interacción proteína-proteína, o dominios de unión a ADN de factores de transcripción y reguladores.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "chaperona específica para el sitio activo" se refiere a cualquier molécula, incluyendo una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, etc., que interactúa específicamente de manera reversible con un sitio activo de una proteína y potencia la formación de una conformación molecular estable. Tal como se utiliza en esta memoria, "chaperona específica para el sitio activo" no incluye chaperonas

20 generales endógenas presentes en el ER de las células tales como Bip, calnexina o calreticulina, o chaperonas químicas generales, no específicas, tales como agua deuterada, DMSO o TMAO.

**Definiciones Generales.** El término "purificado", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a material que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluidos materiales nativos de los que se obtiene el material. Por ejemplo, una proteína purificada

30 está de preferencia sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula; una molécula de ácido nucleico purificada está de preferencia sustancialmente libre de proteínas u otras moléculas de ácido nucleico no relacionadas con las que se puede encontrar dentro de una célula. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente libre" se utiliza operacionalmente, en el contexto del ensayo analítico del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 95% puro; más preferiblemente, al menos 97% puro, y aún más preferiblemente al menos 99% puro. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, y otros métodos conocidos en la técnica. En una realización específica, purificado significa que el nivel de contaminantes está por debajo de un nivel aceptable para las autoridades reguladoras para la administración a un

35 ser humano o animal no humano.

En realizaciones preferidas, las expresiones "alrededor de" y "aproximadamente" deben dar a entender, en general, un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Grados de error típicos ilustrativos se encuentran dentro de 20 por ciento (%), preferentemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5% de un valor dado o un intervalo de valores. Alternativamente, y particularmente en

40 sistemas biológicos, las expresiones "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 10 ó 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces un valor dado. Cantidades numéricas dadas en esta memoria son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que la expresión "alrededor de" o "aproximadamente" se puede inferir cuando no se establezca expresamente.

Un "gen" es una secuencia de nucleótidos que codifica un "producto génico" funcional. Generalmente, un producto génico es una proteína funcional. Sin embargo, un producto génico también puede ser otro tipo de molécula en una célula, tal como un ARN (p. ej., un ARNt o un ARNr). Para los fines de la presente invención, un producto génico

50 también se refiere a una secuencia de ARNm que puede encontrarse en una célula.

El término "expresar" y "expresión" significa permitir o provocar que la información en un gen o secuencia de ADN se ponga de manifiesto, por ejemplo, producir ARN (tal como ARNr o ARNm) o una proteína ejemplo mediante la

55

activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción de un gen o una secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN es expresada por una célula para formar un "producto de expresión" tal como un ARN (p. ej., un ARNm o un ARNr) o una proteína. También se puede decir que el producto de expresión en sí mismo, p. ej., el ARN o proteína resultante, es "expresado" por la célula.

- 5 El término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula. El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula huésped de modo que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, en este invención, típicamente un ARN codificado por el gen o la secuencia introducido, pero también una proteína o una enzima codificada por el gen o secuencia introducido. El gen o la
- 10 secuencia introducido también pueden denominarse un gen o secuencia "clonado" o "exterior", puede incluir secuencias reguladoras o de control (p. ej., inicio, parada, promotor, señal, secreción u otras secuencias utilizadas por la maquinaria genética de una célula). El gen o la secuencia pueden incluir secuencias no funcionales o secuencias sin función conocida. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula huésped pueden
- 15 proceder de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula huésped o células de un género o especie diferente.

Los términos y expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen extraño) puede ser introducida en una célula huésped con el fin de transformar el huésped y fomentar la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

- 20 La expresión "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula huésped. Sistemas de expresión comunes incluyen células huéspedes de *E. coli* y vectores de plásmidos, células huéspedes de insecto tales como Sf9, Hi5 o S2 y vectores baculovirus, y sistemas de expresión, y células huéspedes de mamíferos y vectores.

- 25 Los términos "mutante" y "mutación" significa cualquier cambio detectable en el material genético, p. ej., ADN, o cualquier proceso, mecanismo o resultado de dicho cambio. Esto incluye mutaciones genéticas, en las que se altera la estructura (p. ej., secuencia de ADN) de un gen, cualquier gen o ADN que surja de cualquier proceso de mutación, y cualquier producto de expresión (p. ej., ARN, proteína o enzima) expresado por un gen o secuencia de ADN modificado.

- 30 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "proteína mutante" se refiere a proteínas traducidas a partir de genes que contienen mutaciones genéticas que dan lugar a secuencias de proteínas alteradas. En una realización específica, mutaciones de este tipo dan lugar a la incapacidad de la proteína de alcanzar su conformación nativa en las condiciones normalmente presentes en el ER. El fracaso para lograr esta conformación resulta en que se degraden estas proteínas en lugar de ser transportadas a través de su vía normal en el sistema de transporte de
- 35 proteínas a su ubicación adecuada dentro de la célula. Otras mutaciones pueden resultar en una actividad disminuida o en un más rápido recambio.

- Un "gen de tipo salvaje" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína capaz de tener actividad funcional biológica normal *in vivo*. La secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje puede contener cambios de nucleótidos que difieren de la secuencia publicada, conocida, siempre que los cambios resultan en sustituciones de aminoácidos que tengan poco o ningún efecto sobre la actividad biológica. La expresión de tipo salvaje también
- 40 puede incluir secuencias de ácido nucleico manipuladas para codificar una proteína capaz de una actividad aumentada o mejorada con relación a la proteína endógena o nativa.

- Una "proteína de tipo salvaje" se refiere a cualquier proteína codificada por un gen de tipo salvaje que es capaz de tener actividad biológica funcional cuando se expresa o se introduce *in vivo*. La expresión "actividad de tipo salvaje normal" se refiere a la función fisiológica normal de una proteína en una célula. Dicha funcionalidad puede ser
- 45 sometida a ensayo por cualquier medio conocido para establecer la funcionalidad de una proteína.

- La expresión "genéticamente modificada" se refiere a células que expresan un producto génico particular tras la introducción de un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante que codifica el producto génico, junto con elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia codificante. La introducción del ácido nucleico
- 50 puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la fijación como objetivo de genes y la recombinación homóloga. Tal como se utiliza en esta memoria, el término también incluye células que han sido modificadas para expresar o sobre-expresar un gen endógeno o un producto génico normalmente no expresado por este tipo de célula, p. ej., mediante la tecnología de activación de genes.

La frase "farmacéuticamente aceptable", ya se utilice en relación con las composiciones farmacéuticas de la invención, se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen típicamente reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una Agencia Reguladora del Gobierno Federal o Estatal, o listado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Soportes farmacéuticos de este tipo pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites. Agua o disoluciones acuosas salinas y dextrosa acuosa y glicerol se emplean preferiblemente como soportes, particularmente para soluciones inyectables. Soportes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences". de E.W. Martin, 18ª Edición.

Las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a la cantidad del compuesto que es suficiente para provocar una respuesta terapéutica. En realizaciones en las que una ASSC y proteína se administran en un complejo, las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" pueden referirse a la cantidad del complejo que es suficiente para provocar una respuesta terapéutica. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (p. ej., un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia. Por lo tanto, una respuesta terapéutica será generalmente una mejora de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno.

Cabe señalar que una concentración de la ASSC que es inhibidora durante la producción, transporte o almacenamiento *in vitro* de la proteína terapéutica purificada puede todavía constituir una "cantidad eficaz" para los propósitos de esta invención a causa de la dilución (y el consiguiente desplazamiento en la unión debido al cambio en el equilibrio), la biodisponibilidad y el metabolismo de la ASSC tras la administración *in vivo*.

#### **Trastornos Caracterizados por Deficiencias de Proteínas**

Actualmente existen alrededor de 1100 los trastornos hereditarios conocidos caracterizados por la deficiencia de proteína o la pérdida de función en el tejido específico. Estos trastornos pueden ser tratados, en teoría, mediante terapia de reemplazo de proteínas. El método de la presente invención contempla la co-terapia para proteínas actualmente adecuadas para su uso en la terapia de reemplazo de proteína que está disponible ahora o lo estará en el futuro. En tales trastornos, determinadas células o todas las células de un individuo carecen de una proteína funcional suficiente, contienen una forma inactiva de la proteína o contienen niveles insuficientes para la función biológica.

Además, está aumentando la lista de enfermedades identificadas como trastornos conformacionales, provocadas por mutaciones que alteran el plegamiento de proteínas y el retraso de la proteína mutante en el ER, lo que resulta en la deficiencia de proteínas. Estos incluyen fibrosis quística, deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Fabry, enfermedad de Alzheimer (Selkoe, *Annu. Rev. Neurosci.* 1994; 17:489-517), osteogénesis imperfecta (Chessler et al, *J. Biol. Chem.* 1993; 268:18226-18233), síndrome de glicoproteína deficiente en hidratos de carbono (Marquardt et al, *Eur. J. Cell. Biol.* 1995; 66: 268-273), síndrome de Maroteaux-Lamy (Bradford et al., *Biochem. J.* 1999; 341: 193-201), ceguera hereditaria (Kaushal et al, *Biochemistry* 1994; 33:6121-8), trombastenia de Glanzmann (Kato et al, *Blood* 1992; 79:3212-8), deficiencia hereditaria de factor VII (Arbini et al, *Blood* 1996; 87:5085-94), albinismo oculocutáneo (Halaban et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:5889-94) y deficiencia de proteína C (Katsumi, et al, *Blood* 1996; 87:4164-75). Recientemente, una mutación en la enfermedad adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD), dio lugar a un plegamiento incorrecto del transportador de peroxisomas defectuoso que podría ser rescatado por el cultivo a baja temperatura de las células afectadas (Walter et al, *Am J Hum Genet* 2001; 69: 35-48). En general se acepta que las mutaciones tienen lugar de manera uniforme sobre toda la secuencia de un gen. Por lo tanto, es previsible que exista el fenotipo resultante de un mal plegamiento de la proteína deficiente en muchos otros trastornos genéticos.

#### **Trastornos Lisosomales de Almacenamiento**

Muchos de los trastornos de déficit proteico heredados son deficiencias enzimáticas. Como se indicó anteriormente, una gran clase de herencia, trastornos enzimáticos heredados implica mutaciones en las enzimas lisosomales y se conocen como enfermedades de depósito lisosomal (LSDs). Los trastornos de almacenamiento lisosomal son un grupo de enfermedades provocadas por la acumulación de glicoesfingolípidos, glucógeno, mucopolisacáridos. Ejemplos de trastornos lisosomales incluyen pero no se limitan a la enfermedad de Gaucher (Beutler et al., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª ed. 2001 Scriver et al. , ed. págs. 3635-3668, McGraw-Hill, Nueva York), GM1-gangliosidosis (*id.*, en las págs.. 3775-3810), fucosidosis (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. y Valle, D., ed págs. 2529-2561, McGraw-Hill, Nueva York), mucopolisacaridosis (*id.*, en las págs. 3421-3452), la enfermedad de Pompe (*id.*, en las págs. 3389-3420), la enfermedad de Hurler-Scheie (Weismann et al., *Science* 1970; 169, 72-74), enfermedades de Niemann-Pick A y B,

(*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª ed. 2001. Scriver et al. comp., págs. 3589-3610, McGraw-Hill, Nueva York), y la enfermedad de Fabry (*id.* en las págs. 3733-3774). Una lista de LSDs y sus enzimas deficientes asociadas se puede encontrar en la **Tabla 1** infra. Dos se discuten específicamente a continuación.

### Enfermedad de Fabry

5 La enfermedad de Fabry es un error innato ligado al cromosoma X del metabolismo de los glicoesfingolípidos provocado por una actividad de  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A) lisosomal deficiente (Desnick et al., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª Edición Scriver et al. comp., págs. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York 2001; Brady et al., N. Engl. J. Med. 1967; 276,1163-1167). Este defecto enzimático conduce a la deposición progresiva de glicoesfingolípidos neutros con residuos  $\alpha$ -galactosilo, predominantemente globotriaosilceramida (GL-3), en fluidos corporales y los lisosomas de tejido. La frecuencia de la enfermedad se estima en alrededor de 1:40.000 en los hombres, y se reseña en todo el mundo dentro de diferentes grupos étnicos. En los hombres clásicamente afectados, las manifestaciones clínicas incluyen angioqueratoma, acroparestesia, hipohidrosis y opacidades de la córnea y lenticulares características (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª Edición 2001 Scriver et al. comp., págs. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York). La esperanza de vida del varón afectado se reduce, y la muerte se produce generalmente en la cuarta o quinta década como consecuencia de la enfermedad vascular del corazón, cerebro y/o riñones. En contraposición, pacientes con la más leve "variante cardiaca" tienen normalmente 5-15% de la actividad normal de  $\alpha$ -Gal A, y está presente con la hipertrofia ventricular izquierda o una cardiomiopatía. Estos pacientes variantes cardiacos siguen siendo esencialmente asintomáticos cuando sus homólogos clásicamente afectados se ven seriamente comprometidos. Recientemente, se encontraron variantes cardiacas en el 11% de los pacientes varones adultos con cardiomiopatía hipertrófica del ventrículo izquierdo inexplicable, lo que sugiere que la enfermedad de Fabry puede ser más frecuente de lo previamente estimado (Nakao et al., N. Engl. J. Med. 1995; 333: 288-293). El gen  $\alpha$ -Gal A ha sido representado en mapa en Xq22, (Bishop et al., Am. J. Hum. Genet. 1985; 37: A144), y se han reseñado el ADNc de longitud completa y la totalidad de las secuencias genómicas de 12 kb que codifican  $\alpha$ -Gal A (Calhoun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 7364-7368; Bishop et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 4859-4863; Tsuji et al., Eur. J. Biochem. 1987; 165: 275-280; y Kornreich et al., Nucleic Acids Res. 1989; 17: 3301-3302). Hay una marcada heterogeneidad genética de mutaciones que provocan la enfermedad de Fabry (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª Edición 2001, Scriver et al. comp., págs. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York; Eng et al., Am. J. Hum. Genet. 1993; 53: 1186-1197; Eng et al., Mol. Med. 1997; 3: 174-182; y Davies et al., Eur. J. Hum. Genet. 1996; 4: 219-224). Hasta la fecha, se ha reseñado una diversidad de mutaciones de sentido incorrecto, sin sentido y de corte y empalme, además de pequeñas deleciones e inserciones, y grandes reordenamientos de genes.

### Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es una deficiencia de la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa lisosomal que descompone glucocerebrósidos grasos. La grasa se acumula entonces, principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea. La enfermedad de Gaucher puede resultar en dolor, fatiga, ictericia, lesión de los huesos, anemia e incluso la muerte. Existen tres fenotipos clínicos de la enfermedad de Gaucher. Pacientes de Tipo 1 manifiestan ya sea en una fase temprana de la vida o en la adultez temprana, moratones con facilidad y experimentan fatiga debido a la anemia, plaquetas bajas, agrandamiento del hígado y bazo, debilitamiento del esqueleto y, en algunos casos, tienen discapacidad pulmonar y renal. No hay signos de implicación cerebral. En el tipo II, se produce un brote temprano, agrandamiento del hígado y bazo a los 3 meses de edad y existe una amplia implicación cerebral. Existe una alta tasa de mortalidad a los 2 años. El tipo III se caracteriza por agrandamientos del hígado y bazo y convulsiones del cerebro. El gen  $\beta$ -glucocerebrosidasa está situado en el cromosoma 1q21 humano. Su precursor de proteína contiene 536 aminoácidos y su proteína madura es de 497 aminoácidos de longitud.

La enfermedad de Gaucher es considerablemente más común en los descendientes de los judíos de Europa del Este (asquenazí), aunque individuos de cualquier grupo étnico pueden verse afectados. Entre la población judía asquenazí, la enfermedad de Gaucher es el trastorno genético más frecuente, con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 450 personas. En el público en general, la enfermedad de Gaucher afecta a aproximadamente 1 de cada 100.000 personas. De acuerdo con la Fundación Nacional de Gaucher, 2.500 estadounidenses padecen la enfermedad de Gaucher.

### 50 Otros Trastornos por Deficiencia de Enzimas

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la deficiencia de la enzima humana ligada a X más común. La enzima G6PD cataliza una reacción de oxidación/reducción que es esencial para la producción de ribosa, que es un componente esencial tanto de ADN como de ARN. G6PD también está implicada en el mantenimiento de niveles adecuados de NADPH dentro de la célula. NADPH es un cofactor requerido en muchas reacciones

biosintéticas. Individuos con esta deficiencia tienen síntomas clínicos que incluyen ictericia neonatal, dolor abdominal y/o de espalda, mareos, dolor de cabeza, disnea (respiración irregular) y palpitaciones.

Además de los trastornos hereditarios, otras deficiencias enzimáticas surgen de daño a un tejido u órgano que resulta de trastornos primarios o secundarios. Por ejemplo, el tejido pancreático dañado, o pancreatitis, es provocado por resultados de alcoholismo en una deficiencia de las enzimas pancreáticas necesarias para la digestión. La pancreatitis está siendo tratada actualmente utilizando una terapia de reemplazo enzimático.

**Tabla 1: Trastornos de Almacenamiento Lisosomal, Enzimas Defectuosas Asociadas y Chaperonas Específicas para el Sitio Activo de Moléculas Pequeñas**

TRASTORNO	ENZIMA DEFICIENTE	CHAPERONA REVERSIBLE
Enfermedad de Pompe	$\alpha$ -glucosidasa	1-desoxinojirimicina (DNJ) $\alpha$ -homonojirimicina castanoespermina
Enfermedad de Gaucher	$\beta$ -glucosidasa ácida (glucocerebrosidasa)	isofagomina N-dodecil-DNJ calisteginas A <sub>3</sub> , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> y C <sub>1</sub>
Enfermedad de Fabry	$\alpha$ -galactosidasa A	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) $\alpha$ - <i>allo</i> -homonojirimicina $\alpha$ - <i>galacto</i> -homonojirimicina $\beta$ -1-C-butil-desoxinojirimicina Calisteginas A <sub>2</sub> y B <sub>2</sub> N-metil calisteginas A <sub>2</sub> y B <sub>2</sub>
G <sub>M1</sub> -gangliosidosis	$\beta$ -galactosidasa ácida	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina
Enfermedad de Morquio B	$\beta$ -galactosidasa ácida	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina
$\alpha$ -manosidosis	$\alpha$ -manosidasa ácida	1-desoximanojirimicina Swainsonina Manostatina A
$\beta$ -manosidosis	$\beta$ -manosidasa ácida	2-hidroxi-isofagomina
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa ácida	1-desoxifuconojirimicina $\beta$ -homofuconojirimicina 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol 2,5-desoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol
Enfermedad de Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina
Enfermedad de Schindler	$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galactonojirimicina
Enfermedad de Tay-Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa A	2-N-acetilamino-isofagamina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina Nagstaína
Enfermedad de Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa B	2-N-acetamido-isofagamina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina nagstaína
Enfermedad de Hurler-Scheie	$\alpha$ -L-iduronidasa	1-desoxiduronojirimicina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Enfermedad de Sly	$\beta$ -glucuronidasa	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Sialidosis	Sialidasa	Ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico Siastatina B
Enfermedad de Hunter	Iduronato sulfatasa	2,5-amhidromanitol-6-sulfato
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa ácida	desipramina, fosfatidilinositol-4,5-difosfato

**Otros Trastornos Tratados Utilizando el Reemplazo de Proteínas**

Además de trastornos caracterizados por deficiencias de proteínas, algunos trastornos son tratados mediante la administración de proteínas de reemplazo para potenciar o estimular los procesos biológicos. Por ejemplo, a individuos con anemia se les administra eritropoyetina recombinante (EPOGEN®, PROCRIT®, EPOIETIN®) para estimular la producción de glóbulos rojos y aumentar el transporte de oxígeno a los tejidos. Además, se administran interferones recombinantes tales como interferón alfa 2b (INTRON A®, PEG-INTRON® o REBETOL®) e interferón beta 1a (AVONEX®, BETASERON®) para tratar la hepatitis B y la esclerosis múltiple, respectivamente. Todavía otras proteínas administradas son desoxirribonucleasa I humana recombinante (rhDNasa-PULMOZYME®), una enzima que escinde selectivamente ADN utilizado para mejorar la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística; hormona estimulante del tiroides recombinante (THYROGEN®) desarrollada para su uso en pacientes con cáncer de tiroides que han tenido tiroidectomía casi total o total, y que, por lo tanto, deben tomar hormonas tiroideas; G-CSF recombinante (NEUPOGEN®) para el tratamiento de la neutropenia de la quimioterapia, y enzimas digestivas en individuos con pancreatitis. Otro sector importante de la terapia de proteínas es en el tratamiento de enfermedades infecciosas y el cáncer con anticuerpos que tienen un sitio activo altamente específico y bien definido. Productos terapéuticos de anticuerpos incluyen RESPIRGRAM® para el virus sincitial respiratorio, HERCEPTIN® para el cáncer de mama; REMICAID® y HUMIRA®, para la artritis y enfermedades inflamatorias, y otros. Las ASSCs para anticuerpos son bien conocidas, y se puede emplear el antígeno diana o un análogo estructuralmente relacionado (p. ej., una forma modificada de la diana activa o un mimético). Véase la **Tabla 2** que figura a continuación para una lista de las proteínas actualmente en el mercado o que se están evaluando en ensayos clínicos para su uso como terapia de proteínas.

**Tabla 2: Proteínas de Reemplazo Administradas en Trastornos Asociados**

Proteína	Nombre Comercial	Función Terapéutica	Fase de desarrollo
(rhuMab-VEGF)	Dynepo™	anemia asociada con enfermedad renal	Fase III
a-L-iduronidasa	Aldurazyme™	mucopolisacaridosis-I	Comercialmente disponible
alronidasa	ADNr insulina	diabetes	Fase III
alteplasa	Activase®	infarto de miocardio agudo; embolismo pulmonar masivo agudo; apoplejía isquémica en las 3 a 5 horas del brote del síntoma	Comercialmente disponible
Darbepoyetina alfa	Aranesp™	anemia	Comercialmente disponible
Desoxirribonucleasa I	Pulmozyme	fibrosis quística	Comercialmente disponible
Drotrecogina alfa (proteína C activada)	Xigris™	sepsis severa	Comercialmente disponible
efalizumab	Raptiva®	psoriasis de moderada a severa	Comercialmente disponible
eritropoyetina	EPOGEN®	anemia	Comercialmente disponible
eritropoyetina	PROCRIT®	anemia	Comercialmente disponible
etanercept	Enbrel®	artritis reumatoide; artritis psoriática	Comercialmente disponible
factor IX	BeneFIX™	hemofilia B	Comercialmente disponible
hormona estimulante de folículos	Follistim®	infertilidad	Comercialmente disponible
G-CSF	Neupogen	neutropenia que resulta de quimioterapia	Comercialmente disponible
glucocerebrosidasa	Cerezyme™	enfermedad de Gaucher	Comercialmente disponible
GM-CSF	KGF (Repifermin)	mucositis	Fase III completada
hormona del crecimiento	BioTropin™	deficiencia en hormona del crecimiento en niños	Comercialmente disponible
proteína de choque térmico	Leukine®	mucositis y melanoma	Comercialmente disponible
insulina	Humalog®	diabetes	Comercialmente disponible
interferón	Actimmune®	fibrosis pulmonar idiopática	Comercialmente disponible
interferón alfa	Enbrel® (enterecept)	espondilitis anquilosante, psoriasis	Comercialmente disponible

Tabla 2 (continúa)

Proteína	Nombre Comercial	Función Terapéutica	Fase de desarrollo
interferón alfa-2a	Roferon®-A	leucemia de células pilosas; sarcoma de Kaposi; leucemia mielógena recombinante crónica; hepatitis C	Comercialmente disponible
interferón alfa-n3	Actimmune®	infecciones fúngicas sistémicas	Comercialmente disponible
interferón alfa-n3	Alferon N	verrugas genitales	Comercialmente disponible
interferón beta-1a	Avonex®	esclerosis múltiple recidiva	Comercialmente disponible
interferón beta-1a	Pegasys®	hepatitis C crónica	Comercialmente disponible
interferón beta-1b	Betaseron®	esclerosis múltiple recidiva, remitente	Comercialmente disponible
interferón beta-1b	Rebif®	hepatitis C crónica	Comercialmente disponible
interferón gamma 1b	Actimmune®	enfermedad granulomatosa crónica; osteopetrosis	Comercialmente disponible
agalsidasa beta	Fabrazyme™	enfermedad de Fabry	Comercialmente disponible
interlequina-2	Proleukin®	carcinoma de células renales; melanoma metastásico	Comercialmente disponible
factor de crecimiento de queratinocitos	Avastin™	cáncer colorrectal	Fase III completada
lepirudina (anticoagulante)	Refludan™	trombocitopenia inducida por heparina tipo II	Comercialmente disponible
omalizumab	Xolair®	asma relacionado con alergia	Comercialmente disponible
rasburicasa	Elitek®	hiperuricemia	Comercialmente disponible
reteplasa (factor de plasminógeno tisular)	Retavase®	infarto de miocardio agudo	Comercialmente disponible
hormona estimulante del tiroides	Thyrogen®	cáncer de tiroides	Comercialmente disponible
TNF-alfa	Oncophage®	cáncer colorrectal, de células renales, melanoma	Fase III
trastuzumab	Herceptin®	cáncer de mama metastásico que sobre-expresa HER2	Comercialmente disponible

### Tratamiento de Deficiencias de Proteínas y Otros Trastornos

5 Como se mencionó brevemente arriba, la terapia génica, la terapia de reemplazo de proteínas y la terapia de inhibidor de moléculas pequeñas se han desarrollado como estrategias terapéuticas para el tratamiento de trastornos genéticos que resultan de deficiencias de proteínas y para trastornos que se benefician de la administración de las proteínas de reemplazo.

10 La terapia de reemplazo de proteínas aumenta la cantidad de proteína mediante la introducción exógena de proteína de tipo salvaje o biológicamente funcional por medio de infusión. Esta terapia ha sido desarrollada para muchos trastornos genéticos, incluyendo la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry, como se referencia arriba. La enzima de tipo salvaje se purifica a partir de un sistema de expresión celular recombinante (p. ej., células de mamífero o células de insecto - véanse las Patentes de EE.UU. N°s. 5.580.757 expedida a Desnick et al.; 6.395.884 y 6.458.574 expedidas a Selden et al; 6.461.609 expedida a Calhoun et al; 6.210.666 expedida a Miyamura et al.; 6.083.725 expedida a Selden et al.; 6.451.600 expedida a Rasmussen et al.; 5.236.838 expedida a Rasmussen et al.; y 5.879.680 expedida a Ginns et al.), placenta humana, o leche de origen animal (véase la patente de EE.UU. N° 6.188.045 expedida a Reuser et al.). Después de la infusión, se espera que la enzima exógena sea absorbida por los tejidos a través de un mecanismo no específico o específico para el receptor. En general, la eficiencia de absorción no es alta, y el tiempo de circulación de la proteína exógena es corto (Ioannu et al., Am. J. Hum. Genet. 2001; 68: 14-25). Además, la proteína exógena es inestable y está sometida a una rápida degradación intracelular.

20 Además del reemplazo de proteínas y la terapia génica, la terapia de pequeñas moléculas utilizando inhibidores de la enzima se ha descrito para el tratamiento de LSDs, a saber, inhibidores de moléculas pequeñas útiles para la privación de sustrato de los precursores de la enzima deficiente, arriba referenciado. Inhibidores de moléculas pequeñas se han descrito para el tratamiento de LSDs, incluyendo la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Pompe, la enfermedad de Tay Sachs, la enfermedad de Sandhoff y gangliosidosis GM2 (véanse las patentes de EE.UU. N°s. 5.472.969, 5.580.884, 5.798.366 y 5.801.185 expedidas a Platt et al.).

25

**Co-Terapia Utilizando ASSCs y Reemplazo de Proteínas**

La presente invención aumenta la eficacia de la terapia de reemplazo de proteínas mediante el aumento de la estabilidad de la proteína purificada *in vitro* en una formulación o composición, e *in vivo* por la co-administración de una ASSC para la proteína. El rastreo de una ASSC apropiada para la proteína diana se puede lograr utilizando métodos ordinarios en la técnica.

***Producción de Proteínas de Reemplazo***

Los trastornos que pueden ser tratados utilizando el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a LSDs, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enfisema hereditario, hipercolesterolemia familiar, cardiomiopatía hipertrófica familiar, fenilcetonuria, anemia, hepatitis B y esclerosis múltiple.

Las proteínas de reemplazo útiles para los métodos de la presente invención pueden ser aisladas y purificadas utilizando la biología molecular ordinaria, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la proteína de reemplazo pueden ser aislados utilizando la expresión de ADN recombinante según se describe en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en esta memoria "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning. A practical Approach, Volúmenes I y II* (D. N. Glover comp. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait comp. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Harnes y S. J. E Higgins comps. (1985)]; *Transcription And Translation* [B. D. Harnes y S. J. Higgins, comps. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney, comp. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. EPerbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel et al. (comps.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994). El ácido nucleico que codifica la proteína puede ser de longitud completa o truncado, siempre y cuando el gen codifique una proteína biológicamente activa. Por ejemplo, una forma truncada, biológicamente activa de  $\alpha$ -Gal A, la enzima defectuosa asociada con la enfermedad de Fabry, se ha descrito en la Patente de EE.UU. N° 6.210.666 expedida a Miyamura et al.

El gen identificado y aislado que codifica la proteína diana puede entonces ser insertado en un vector de clonación apropiado. Se puede utilizar un gran número de sistemas de vector-huésped conocidos en la técnica. Posibles vectores incluyen, pero no se limitan a plásmidos o virus modificados, pero el sistema vector debe ser compatible con la célula huésped utilizada. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a *E. coli*, bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos tales como derivados de pBR322 o derivados del plásmido pUC, p. ej., vectores pGEX, pmal-c, pFLAG, etc. La inserción en un vector de clonación se puede conseguir, por ejemplo, ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene extremos cohesivos complementarios. Sin embargo, si los sitios de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) a los extremos del ADN; estos enlazadores ligados pueden comprender oligonucleótidos sintetizados químicamente específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. La producción de la proteína recombinante puede maximizarse mediante manipulaciones genéticas tal como incluyendo un péptido señal en el extremo N para facilitar la secreción o una secuencia 3' no traducida que contiene un sitio de poliadenilación.

En una realización preferida, las construcciones utilizadas para transducir células huésped son vectores derivados de virus, que incluyen pero no se limitan a adenovirus, virus adeno-asociados, virus herpes, virus de las paperas, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis y virus vacuna.

Moléculas recombinantes pueden introducirse en células huésped a través de transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de modo que se generan muchas copias de la secuencia del gen. Preferiblemente, el gen clonado está contenido en un plásmido vector lanzadera que proporciona la expansión en una célula de clonación, p. ej., *E. coli*, y la fácil purificación para la inserción posterior en una línea celular de expresión apropiada, si se desea.

Sistemas de huésped-vector potenciales incluyen, pero no se limitan a sistemas de células de mamíferos infectadas con virus (p. ej., virus vacuna, adenovirus, etc.); sistemas de células de insectos infectadas con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como vectores de levadura que contienen levaduras; o bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN del plásmido o ADN del cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus resistencias y especificidades. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, puede utilizarse uno cualquiera de un cierto número de elementos de transcripción y traducción adecuados. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación de la traducción y post-traducción (p. ej., glicosilación, escisión [p. ej., de la secuencia señal]) de proteínas. Líneas celulares o sistemas huéspedes apropiados se pueden elegir para asegurar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína

extraña expresada tales como glicosilación, sialilación y fosforilación. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano se puede utilizar para producir un producto de proteína de núcleo no glicosilado. Sin embargo, la proteína expresada en bacterias no puede plegarse apropiadamente. La expresión en levaduras puede producir un producto glicosilado. La expresión en células eucariotas puede aumentar la probabilidad de una glicosilación "nativa" y el plegamiento de una proteína heteróloga. Además, la expresión en células de mamífero puede proporcionar una herramienta para reconstituir o constituir la proteína. Además, diferentes sistemas de expresión vector/huésped pueden afectar a las reacciones de procesamiento tales como escisiones proteolíticas, en una medida diferente. La eficacia de la expresión se puede aumentar mediante el uso de una chaperona específica, según se describe en la Patente de EE.UU. N°. 6.274.597, y miembros de la familia relacionados arriba descritos.

La purificación de la proteína expresada de forma recombinante se puede lograr utilizando métodos conocidos en la técnica tales como mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna que contiene resinas de interacción hidrófoba, resinas de intercambio catiónico, resinas de intercambio aniónico, y resinas de cromatoenfoco. Alternativamente, la cromatografía de inmunoafinidad se puede utilizar para purificar la proteína recombinante utilizando un anticuerpo policlonal o monoclonal apropiado que se une específicamente a la proteína, o a una etiqueta que está fusionada a la proteína recombinante. En una realización preferida, la pureza de la proteína recombinante utilizada para el método de la presente invención será de al menos 95%, preferiblemente 97% y más preferiblemente mayor que 98%.

### **Administración de Proteínas de Reemplazo**

Se pueden emplear numerosos métodos para lograr la absorción y la fijación como objetivo de la proteína de reemplazo por parte de las células. Se han identificado las secuencias peptídicas que median en el transporte de membrana y, por consiguiente, proporcionan el suministro de polipéptidos al citoplasma. Por ejemplo, tales péptidos se pueden derivar de la hélice 3 del homeodominio de Antennapedia para generar vectores de transporte de membrana tales como penetratina (publicación PCT WO 00/29427; véase también Fischer et al, J. Pept. Res. 2000; 55: 163-72; DeRossi et al., Trends in Cell Biol. 1998; 8:84-7; Brugidou et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1995; 214:685-93), la proteína VP22 del virus herpes simplex (Phelan et al, Nat. Biotechnol. 1998; 16:440-3), y el activador transcripcional TAT del VIH. Dominios de transducción de proteínas, incluyendo el dominio Antennapedia y el dominio TAT del VIH (véase Vives et al., J. Biol. Chem. 1997; 272:16010-17), poseen una carga positiva característica, que condujo al desarrollo de péptidos 12-meros catiónicos que se puede utilizar para transferir proteínas terapéuticas y ADN en las células (Mi et al., Mol. Therapy 2000; 2:339-47). Los dominios de transducción de proteínas arriba mencionadas están unidos covalentemente a la proteína diana, ya sea por reticulación covalente química o por la generación como una proteína de fusión. Además, un dominio de transducción de proteína sintética no-covalente ha sido desarrollado recientemente por Active Motif Inc. (Carlsbad, CA). Este dominio se asocia con la proteína diana a través de interacciones hidrófobas, y ventajosamente se disocia de la proteína una vez dentro de la célula (Morris et al., Nat. Biotechnol. 2001; 19: 1173-6). Además, soportes de lípidos han demostrado recientemente suministrar proteínas a las células, además de un uso establecido para la entrega de ADN desnudo (Zelphati et al., J. Biol. Chem. 2001; 276:35103-10). Para una visión general de las técnicas de translocación de proteínas véase Bonetta, The Scientist 2002; 16(7):38.

En realizaciones específicas, las proteínas de reemplazo utilizadas en el método de la presente invención son enzimas asociadas con trastornos de almacenamiento lisosomal (véase la **Tabla 1**). Secuencias de ácidos nucleicos que codifican versiones de tipo salvaje de este tipo de enzimas se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas tales como GenBank, p. ej., X14448 para  $\alpha$ -Gal A (AGA), J03059 para glucocerebrosidasa (GCB) humana, M74715 para un  $\alpha$ -liduronidasa (IDUA) humana, M34424 para  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana, AF011889 para iduronato 2-sulfatasa (IDS) humana y M59916 para esfingomielinasa ácida (ASM) humana.

**Reemplazo de Enzimas en LSDs.** Varias enzimas de reemplazo para LSDs están disponibles actualmente en Europa y los EE.UU. Éstas incluyen Cerezyme®, forma recombinante de glucocerebrosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher; Fabrazyme®, forma recombinante de alfa galactosidasa A; Aldurazyme®, una enzima recombinante para el tratamiento de MPS 1, todas de Genzyme Corp. y alfa glucosidasa recombinante para pacientes con enfermedad de Pompe (Van den Hout et al, Lancet 2000; 56:397-8).

### Chaperonas Específicas para el Sitio Activo

Las ASSCs contempladas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a moléculas pequeñas (p. ej., moléculas orgánicas o inorgánicas que son de un peso molecular menor que aproximadamente 2 kD, son de un peso molecular más preferiblemente menor que aproximadamente 1 kD), incluyendo miméticos de sustrato o de participante en la unión; péptidos o miméticos de los mismos derivados de ligandos pequeños; ácidos nucleicos tales como ADN, ARN; anticuerpos, incluyendo Fv y anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos Fab; macromoléculas (p. ej., moléculas de un peso molecular mayor que aproximadamente 2 kD) y miembros de genotecas derivados por

química combinatoria tales como genotecas moleculares de aminoácidos de configuración D y/o L; fosfopéptidos tales como miembros de genotecas de fosfopéptidos aleatorias o parcialmente degeneradas, dirigidas (véase, p. ej., Songyang et al, Cell 1993; 72:767-778).

5 Genotecas sintéticas (Needels et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:10700-4; Ohlmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:10922-10926; Lam et al., publicación PCT N° WO 92/00252; Kocis et al., publicación PCT N° WO 94/28028) proporcionar una fuente de ASSCs potenciales de acuerdo con la presente invención. Genotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), ComGenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), y Microsource (New Milford, CT). Una genoteca química rara está disponible de Aldrich (Milwaukee, WI). Alternativamente, genotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles, p. ej., de Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o se pueden producir fácilmente. Adicionalmente, las genotecas y los compuestos naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente mediante Res. 1986; 155:119-29.

15 En una realización preferida, ASSCs útiles para la presente invención son inhibidores de enzimas lisosomales e incluyen derivados de imino-azúcares glucosa y galactosa tal como se describe en Asano et al., J. Med. Chem 1994; 37:3701-06; Dale et al., Biochemistry 1985; 24:3530-39; Goldman et al., J. Nat. Prod. 1996; 59:1137-42; Legler et al, Carbohydrate Res. 1986; 155:119-29. Derivados de este tipo incluyen, pero no se limitan a los compuestos listados en la **Tabla 1**. Algunos de estos compuestos se pueden adquirir de fuentes comerciales tales como Toronto Investigación Chemicals, Inc. (North York, On. Canadá) y Sigma.

20 En una realización preferida, ASSCs útiles para la presente invención son activadores de los reguladores de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que incluyen compuestos de benzo(c)quinolizino según se describe en Dormer et al., J. Cell Sci. 2001;114:4073-81; y Ma et al., J. Biol. Chem. 2002; 277:37235-41.

25 En otra realización preferida, ASSCs útiles para la presente invención son ligandos de receptores acoplados a proteína G, tales como el receptor opioide  $\delta$ , receptor de la vasopresina V2, y el fotopigmento rodopsina según se describe en Petaja-Repo et al, EMBO J., 2002; 21:1628-37; Morello et al., J. Clin. Invest. 2000; 105: 887-95; Saliba et al., J. Cell Sci. 2002; 115:2907-18.

En otra realización preferida, ASSCs útiles para la presente invención son compuestos que estabilizan el dominio de unión al ADN de p53, según se describe en Foster et al., Science 1999.; 286: 2507-10; Friedler et al., PNAS 2002; 99:937-42.

30 En aún otra realización preferida, ASSCs útiles para la presente invención son bloqueadores de proteínas de los canales de iones, tales como el canal de potasio HERG en el síndrome del QT largo humano, canal de potasio sensible a ATP ( $K_{ATP}$ ) pancreático en el hiperinsulinismo familiar, según se describe en Zhou et al., J Biol. Chem. 1999; 274:31123-26; Taschenberger et al., J. Biol. Chem. 2002; 277:17139-46.

### **Formulaciones**

35 En una realización, la ASSC y la proteína de reemplazo se formulan en una única composición. Una composición de este tipo mejora la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento y la administración *in vivo*, aumentando con ello la eficacia terapéutica. La formulación es preferiblemente adecuada para la administración parenteral, incluyendo subcutánea intravenosa, intraperitoneal, sin embargo, también se contemplan formulaciones adecuadas para otras vías de administración tales como oral, intranasal o transdérmica.

40 En otra realización, la proteína de reemplazo y las ASSCs se formulan en composiciones separadas. En esta realización, la chaperona y la proteína de reemplazo se pueden administrar de acuerdo con la misma vía, p. ej., infusión intravenosa, o por vías diferentes, p. ej., infusión intravenosa para la proteína de reemplazo, y la administración oral para la ASSC.

45 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (en su caso solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y

antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la proteína purificada y la ASSC en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes arriba enumerados, según se requiera, seguido por esterilización por filtración o terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado en vacío y la técnica de liofilización que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

15 Preferiblemente, la formulación contiene un excipiente. Excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la formulación son tampones tales como tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas tales como albúmina de suero, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro sódico; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (p. ej., PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Sistemas tampón para uso con las formulaciones incluyen citrato; acetato; bicarbonato; y tampones fosfato. El tampón fosfato es una realización preferida.

20 La formulación también contiene preferiblemente un detergente no iónico. Detergentes no iónicos preferidos incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, octil  $\alpha$ -glucósido, octil  $\beta$ -glucósido, Brij 35, Pluronic y Tween 20.

25 Para la liofilización de preparaciones de proteína y chaperona, la concentración de proteínas puede ser 0,1-10 mg/mL. Agentes de carga tales como glicina, manitol, albúmina y dextrano, se pueden añadir a la mezcla de liofilización. Además, posibles crioprotectores tales como disacáridos, aminoácidos y PEG, se pueden añadir a la mezcla de liofilización. También se puede añadir cualquiera de los tampones, excipientes y detergentes arriba listados.

30 Formulaciones para administración por inhalación pueden contener lactosa u otros excipientes, o pueden ser disoluciones acuosas que pueden contener polioxietileno-9-lauril-éter, glicocolato o desoxicocolato. Un aerosol de inhalación preferido se caracteriza por tener partículas de pequeña densidad de masa y un gran tamaño. Partículas con densidades de masa de menos de 0,4 gramos por centímetro cúbico y diámetros medios que exceden de 5  $\mu$ m suministran eficazmente productos terapéuticos inhalados en la circulación sistémica. Partículas de este tipo son inspiradas profundamente en los pulmones y escapan de los mecanismos de limpieza natural de los pulmones hasta que las partículas inhaladas suministren su carga útil terapéutica. (Edwards et al, Science 1997; 276:1868-1872).

35 Preparaciones de proteína de reemplazo de la presente invención se pueden administrar en forma de aerosol, por ejemplo utilizando métodos de preparación y formulaciones según se describen en las patentes de EE.UU. N<sup>o</sup>s. 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607, cada una incorporada en esta memoria como referencia. La formulación para la administración intranasal puede incluir disoluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel a ser aplicado por vía intranasal.

40 Formulaciones para administración tópica a la superficie de la piel pueden prepararse dispersando la composición con un soporte dermatológico aceptable tal como una loción, crema, ungüento o jabón. Particularmente útiles son soportes capaces de formar una película o capa sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir su eliminación. Para la administración tópica a superficies de tejido interno, la composición puede dispersarse en un adhesivo tisular líquido u otra sustancia conocida para potenciar la adsorción a una superficie de tejido. Alternativamente, se pueden utilizar disoluciones de revestimiento de tejidos tales como formulaciones que contienen pectina.

45 En realizaciones preferidas, las formulaciones de la invención se suministran en cualquiera de las formulaciones líquidas o en forma de polvo en dispositivos que administran convenientemente una dosis predeterminada de la preparación; ejemplos de tales dispositivos incluyen un inyector sin aguja, ya sea para la inyección subcutánea o intramuscular, y un dispositivo de suministro de aerosol medido. En otros casos, la preparación puede suministrarse en una forma adecuada para la liberación sostenida tal como en un parche o apósito a ser aplicado a la piel para la administración transdérmica, o a través de dispositivos erosionables para la administración transmucosal. En los casos en los que la formulación, p. ej., la ASSC se administra por vía oral en forma de comprimido o cápsula, la preparación puede suministrarse en un frasco con una tapa retirable o como parches blíster.

**Estabilidad in vitro** El asegurar la estabilidad de una formulación farmacéutica durante su vida útil es un reto importante. Antes del desarrollo de un producto farmacéutico proteínico, deben explorarse y abordarse inestabilidades inherentes o latentes dentro de los ingredientes activos. La inestabilidad de productos terapéuticos proteínicos y peptídicos se clasifica como inestabilidad química o inestabilidad física. Ejemplos de inestabilidad química son hidrólisis, oxidación y desamidación. Ejemplos de inestabilidad física son agregación, precipitación y adsorción a superficies. Además, una proteína puede ser sometida a esfuerzos tales como pH, temperatura, esfuerzo de cizalla, esfuerzo de congelación/descongelación y combinaciones de estos esfuerzos.

Uno de los problemas de formulación más prevalentes es la agregación del producto, resultando en una pérdida de bioactividad. La adición de excipientes puede retardar el proceso, pero no puede impedirlo por completo. Pérdidas de actividad pueden o pueden no ser detectadas mediante ensayos físicos y sólo son evidentes en bioensayos o ensayos de potencia con grandes coeficientes de variación (algunas veces de 15-20%), haciendo difícil determinar las pérdidas reales.

La ASSC ha demostrado potenciar la actividad enzimática mediante la prevención de la degradación de enzimas y la agregación de las proteínas enzimáticas (Fan et al, Nat Med 1999; 5:112-5; Fig. 1). En la realización en la que la ASSC y la proteína de reemplazo están en la misma composición, las composiciones formuladas de la invención se pueden proporcionar en recipientes adecuados para el mantenimiento de la esterilidad, y de manera importante, la protección de la actividad de la proteína de reemplazo durante la distribución y el almacenamiento adecuados. Además de la estabilización de la proteína *in vivo*, la ASSC se une de forma reversible a y estabiliza la conformación de la proteína de reemplazo *in vitro*, impidiendo así la agregación y la degradación, y extendiendo la vida útil de la formulación. El análisis de la interacción ASSC/proteína de reemplazo se puede evaluar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, calorimetría diferencial de barrido, o difracción circular.

Por ejemplo, en los casos en los que se suministra una formulación inyectable acuosa de la composición en un vial con tapón adecuado para la retirada de los contenidos utilizando una aguja y una jeringa, la presencia de una ASSC inhibe la agregación de la proteína de reemplazo. El vial puede ser, ya sea para un solo uso o para usos múltiples. La formulación también se puede suministrar como una jeringa rellena. En otra realización, la formulación está en un estado seco o liofilizado, lo que requeriría la reconstitución con un diluyente fisiológico, estándar o suministrado, a un estado líquido. En este caso, la presencia de una ASSC estabilizaría la proteína de reemplazo durante y después de la reconstitución para evitar la agregación. En la realización en la que la formulación es un líquido para la administración intravenosa, tal como en una bolsa estéril para la conexión a un conducto de administración intravenosa o catéter, la presencia de una ASSC conferiría el mismo beneficio.

Además de estabilizar la proteína de reemplazo a ser administrada, la presencia de una ASSC puede permitir que la formulación farmacéutica sea almacenada a un pH neutro de aproximadamente 7,0-7,5. Esto conferirá un beneficio a proteínas que normalmente se deben almacenar a un pH inferior para preservar la estabilidad. Por ejemplo, enzimas lisosomales tales como las listadas en la **Tabla 1**, retienen una conformación estable a un pH bajo (p. ej., 5,0 o inferior). Sin embargo, el almacenamiento prolongado de la enzima de reemplazo a un pH bajo puede acelerar la degradación de la enzima y/o formulación.

### **Administración**

La vía de administración puede ser oral o parenteral, incluyendo intravenosa, subcutánea, intra-arterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradental, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosal, transdérmica, o vía inhalación.

La administración de las formulaciones parenterales arriba descritas puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la preparación, o puede administrarse mediante administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (p. ej., una bolsa i.v.) o interno (p. ej., un implante bioerosionable, un órgano bioartificial, o una población de células implantadas que producen la proteína de reemplazo). Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s. 4.407.957 y 5.798.113. Métodos y aparatos de suministro intrapulmonar se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°s. 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607, cada una incorporada en esta memoria como referencia. Otros sistemas de suministro parenteral útiles incluyen partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, suministro mediante bomba, suministro de células encapsuladas, suministro liposomal, inyección suministrada por aguja, inyección sin aguja, nebulizador, dispositivo aerosol, electroporación y parche transdental. Dispositivos inyectoros sin aguja se describen en las patentes de EE.UU. N°s 5.879.327; 5.520.639; 5.846.233. Cualquiera de las formulaciones arriba descritas puede administrarse en estos métodos.

Las inyecciones subcutáneas de la proteína de reemplazo y/o ASSC tienen las ventajas que permiten la auto-administración, mientras que también resulta en una semivida en plasma prolongada en comparación con la administración intravenosa. Además de ello, se puede utilizar una diversidad de dispositivos diseñados para la conveniencia del paciente tales como plumas de inyección recargables y dispositivos de inyección sin aguja, con las formulaciones de la presente invención según se discute en esta memoria.

### Dosis

La cantidad de ASSC eficaz para estabilizar la proteína administrada y la proteína mutante endógena puede determinarse sobre una base de caso por caso, en función de la proteína y de la ASSC correspondiente, por los expertos en la técnica. Se pueden obtener una farmacocinética y una farmacodinámica tales como la semivida ( $t_{1/2}$ ), concentración de plasma pico ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tiempo hasta la concentración de plasma pico ( $t_{m\acute{a}x}$ ), exposición según se mide por el área bajo la curva (AUC) y la distribución en los tejidos tanto para la proteína de reemplazo como la ASSC, así como los datos para la unión ASSC-proteína de reemplazo (constantes de afinidad, constantes de asociación y disociación, y valencia) utilizando métodos ordinarios conocidos en la técnica para determinar las cantidades compatibles requeridas para estabilizar la proteína de reemplazo, sin inhibir su actividad y, por lo tanto, conferir un efecto terapéutico.

Los datos obtenidos del ensayo de cultivo celular o de estudios con animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación terapéutico para uso en seres humanos y animales no humanos. La dosificación de compuestos utilizados en los métodos terapéuticos de la presente invención se encuentran preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la concentración  $DE_{50}$  (eficaz para el 50% de la población sometida a ensayo), pero con poca o ninguna toxicidad. La dosificación particular utilizada en cualquier tratamiento puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de factores tales como la forma de dosificación particular empleada, la vía de administración utilizada, las condiciones del individuo (p. ej., paciente), y así sucesivamente.

Una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular y se puede formular en modelos con animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la  $CI_{50}$ . La concentración  $CI_{50}$  de un compuesto es la concentración que logra una inhibición semi-máxima de los síntomas (p. ej., tal como se determina a partir de los ensayos de cultivo celular). Dosificaciones apropiadas para su uso en un individuo particular, por ejemplo en pacientes humanos, pueden entonces determinarse con mayor exactitud utilizando tal información.

Medidas de compuestos en plasma se pueden medir de forma rutinaria en un individuo tal como un paciente mediante técnicas tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de gases.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de la composición se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares, por ejemplo en ensayos de cultivo celular o utilizando animales de experimentación para determinar la  $LD_{50}$  y la  $DE_{50}$ . Los parámetros  $LD_{50}$  y  $DE_{50}$  son bien conocidos en la técnica, y se refieren a las dosis de un compuesto que es letal para el 50% de una población y es terapéuticamente eficaz en el 50% de una población, respectivamente. A la relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos se la alude como el índice terapéutico y se puede expresar como la relación:  $DL_{50}/DE_{50}$ . Se prefieren ASSCs que exhiben índices terapéuticos grandes.

De acuerdo con los métodos actuales, la concentración de proteína de reemplazo oscila entre 0,05-5, 0 mg/kg de peso corporal, típicamente administrada semanal o quincenalmente. La proteína puede administrarse a una dosificación que oscile entre 0,1  $\mu$ g/kg y aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. Por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la dosis de  $\alpha$ -GAL A recombinante administrada oscila típicamente entre 0,1-0,3 mg/kg y se administra semanal o quincenalmente. Dosis regularmente repetidas de la proteína son necesarias durante la vida del paciente. Las inyecciones subcutáneas mantienen la exposición sistémica durante un plazo más largo al fármaco. La dosis subcutánea es preferiblemente 0,1-5,0 mg de la  $\alpha$ -Gal A por kg de peso corporal quincenal o semanalmente. La  $\alpha$ -Gal A también se administra por vía intravenosa, p. ej., en una inyección en bolo intravenosa, en una inyección intravenosa de empuje lento o mediante inyección intravenosa continua. La infusión IV continua (p. ej., a lo largo de 2-6 horas) permite el mantenimiento de niveles específicos en la sangre.

Las concentraciones óptimas de la ASSC se determinarán de acuerdo con la cantidad requerida para estabilizar la proteína recombinante *in vivo*, en el tejido o la circulación, sin impedir su actividad, biodisponibilidad de la ASSC en el tejido o en circulación y el metabolismo de la ASSC en el tejido o en circulación. Por ejemplo, en los casos en los que la ASSC es un inhibidor enzimático, la concentración del inhibidor se puede determinar calculando el valor  $CI_{50}$  de la chaperona específica para la enzima. Teniendo en cuenta la biodisponibilidad y el metabolismo del compuesto, concentraciones en torno al valor  $CI_{50}$  o ligeramente por encima del valor  $CI_{50}$  pueden entonces ser evaluadas en

base a efectos sobre la actividad de la enzima, p. ej., la cantidad de inhibidor necesaria para aumentar la cantidad de actividad de la enzima o prolongar la actividad enzimática de la enzima administrada. Como un ejemplo, el valor  $CI_{50}$  del compuesto desoxigalactonojiromicina (DGJ) para la enzima  $\alpha$ -Gal A es 0,04,  $\mu$ M, lo que indica que DGJ es un potente inhibidor. Por consiguiente, se espera que la concentración intracelular de  $\alpha$ -Gal A sería mucho menor que la de la  $\alpha$ -Gal A administrada. Véanse los Ejemplos a continuación.

## EJEMPLOS

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, que se presentan a continuación.

### **Ejemplo 1: Estabilización *in vitro* de una $\alpha$ -Gal A Con ASSCs**

**Métodos.** La  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje se purificó a partir de medio de cultivo de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes que portan ADNc de  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje humano y el mutante  $\alpha$ -Gal A se recogió como homogeneizados de corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan  $\alpha$ -Gal A humana mutante (R301Q). Los ratones fueron tratados con DGJ 0,5 mM como agua potable durante una semana antes del experimento. Las enzimas mutantes y de tipo salvaje se pre-incubaron con tampón de citrato-fosfato 0,1 M (pH 7,0) a 37°C para la enzima mutante y a 42°C para la enzima de tipo salvaje, respectivamente, en presencia de DGJ a una concentración de 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,03  $\mu$ M o sin DGJ. Las  $\alpha$ -Gal A de tipo salvaje y mutante (R301Q) se incubaron durante un período de tiempo en ausencia o presencia de DGJ (diversas concentraciones), y la actividad enzimática restante se determinó con 4-MU- $\alpha$ -Gal A como un sustrato, después de diluir la mezcla con 5 volúmenes de tampón citrato 0,1 M (pH 4,5). La actividad enzimática se reseña en relación con la enzima sin pre-incubación.

### **Resultados.**

Como se muestra en la **Fig. 1**, la enzima mutante no era estable a pH neutro después de incubación a 37°C durante 20 min sin incubación con DGJ (Fig. 1A). La enzima de tipo salvaje también perdió actividad enzimática significativa a pH neutro a 42°C sin incubación con DGJ (Fig. 1B). La estabilidad de ambas enzimas se puede mejorar mediante la inclusión de DGJ a una concentración de 1  $\mu$ M, es decir, más del 80% de la actividad enzimática permanecía en la mezcla de reacción durante 60 min. Esto indica que la ASSC (DGJ) puede servir como un estabilizador para evitar la desnaturalización/degradación de las enzimas mutantes y de tipo salvaje.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para mejorar la estabilidad *in vitro* o para aumentar la vida útil *in vitro* de una  $\alpha$ -galactosidasa A de tipo salvaje humana recombinante purificada en una formulación que tiene un pH entre 7,0 y 7,5 para la administración parenteral a un ser humano, poniendo en contacto la  $\alpha$ -galactosidasa A en un soporte farmacéuticamente aceptable con 1-desoxigalactonojirimicina en una cantidad eficaz para aumentar la estabilidad *in vitro* o para aumentar la vida útil de la  $\alpha$ -galactosidasa A purificada, en donde la  $\alpha$ -galactosidasa A no es una  $\alpha$ -galactosidasa A mutante que esté incorrectamente plegada en una conformación biológicamente inactiva.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la  $\alpha$ -galactosidasa A está asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que la  $\alpha$ -galactosidasa A, el soporte farmacéuticamente aceptable y 1-desoxigalactonojirimicina se formulan en un polvo liofilizado.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la  $\alpha$ -galactosidasa A, el soporte farmacéuticamente aceptable y 1-desoxigalactonojirimicina se formulan en una disolución acuosa estéril.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en el que la  $\alpha$ -galactosidasa A está asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal.
- 20 6. Una composición farmacéutica que comprende una  $\alpha$ -galactosidasa A de tipo salvaje humana recombinante purificada y 1-desoxigalactonojirimicina en un soporte farmacéuticamente aceptable, en donde la  $\alpha$ -galactosidasa A purificada y 1-desoxigalactonojirimicina están en una formulación que tiene un pH entre 7,0 y 7,5 para la administración parenteral a un ser humano, y en donde la  $\alpha$ -galactosidasa A no es una  $\alpha$ -galactosidasa A mutante que está incorrectamente plegada en una conformación biológicamente inactiva.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde la  $\alpha$ -galactosidasa A está asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde la formulación es un líquido estéril para la administración intravenosa.

