

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 377**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12803297 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2723369**

54 Título: **Composición y formulación que comprende iduronato-2-sulfatasa humana recombinante y método de preparación de la misma**

30 Prioridad:

24.06.2011 US 201161500994 P
08.02.2012 KR 20120012718

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

28.06.2016

73 Titular/es:

GREEN CROSS CORPORATION (50.0%)
107 Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si
Gyeonggi-do 446-855, KR y
MEDIGENEBIO CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

JIN, THONG-GYU;
CHUNG, YO KYUNG;
PAIK, SANG HOON;
PARK, YOO CHANG;
SEO, JINWOOK;
CHOI, YONG WOON;
SON, JONG MUN y
KIM, YONG-CHUL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 377 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

Composición y formulación que comprende iduronato-2-sulfatasa humana recombinante y método de preparación de la misma

5 **Campo técnico.**

La presente invención se refiere a una composición que comprende iduronato-2-sulfatasa humana (en adelante denominada "IDS"), una formulación que la comprende la composición, un método para prepararla y su uso para el tratamiento del síndrome de Hunter.

10 Más en particular, la composición para el tratamiento del síndrome de Hunter de acuerdo con la presente invención comprende como ingrediente activo IDS que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, en donde el resto de cisteína en la posición 59 en la secuencia de aminoácidos IDS de la SEQ ID NO: 1 se convierte en formilglicina (FGly: ácido 2-amino-3-oxopropiónico) en una relación molar de 65% o superior, preferiblemente en una relación molar de 75% o mayor, y más preferiblemente en una relación molar de 80% o mayor. Además, la IDS
15 contenida en la composición para el tratamiento del síndrome de Hunter contiene manosa-6-fosfato en una cantidad de 2,0 a 4,0 moles por mol de IDS, preferiblemente en una cantidad de 2,3 a 3,5 moles, y más preferiblemente en una cantidad de 2,5 a 3,0 moles.

El método para preparar la composición para el tratamiento del síndrome de Hunter, de acuerdo con la presente invención comprende:

20 (1) cultivar una cepa de células recombinantes transformadas con un gen que codifica IDS representada por SEQ ID NO: 1 y la obtención del cultivo; y

(2) purificar el cultivo mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad,

caracterizado por que

la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo utilizando un tampón de elución con un pH de 4,0 a 6,0.

25 Teniendo ventajas sobre los productos convencionales en términos de eficacia y seguridad farmacéutica, la composición terapéutica que comprende IDS y la formulación que comprende la misma puede ser utilizada con eficacia para tratar el síndrome de Hunter.

Técnica de base.

30 El síndrome de Hunter o mucopolisacáridosis de tipo II es una enfermedad de almacenamiento lisosomal (LSD) en la que los mucopolisacáridos, también conocidos como glicosaminoglicanos (GAG), no se degradan correctamente y se acumulan en el cuerpo debido a un déficit de IDS. A medida que los GAG continúan acumulándose por las células del cuerpo, se hacen más visibles varios signos de síndrome de Hunter. Las manifestaciones físicas para algunas personas con síndrome de Hunter incluyen características faciales distintas y una cabeza grande. Entre los
35 síntomas representativos del síndrome de Hunter están un abdomen agrandado debido a la hepatomegalia o esplenomegalia, sordera, cardiopatía valvular, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias y apnea del sueño. Además, pueden verse afectadas las principales articulaciones por el síndrome de Hunter, lo que conduce a la rigidez y la limitación del movimiento de las articulaciones. En algunos casos de síndrome de Hunter, la implicación del sistema nervioso central conduce a retrasos en el desarrollo y problemas del sistema nervioso. Se sabe que el síndrome de Hunter se produce a razón de 1 en 162.000 y es un trastorno genético en forma de recesiva ligado al
40 cromosoma X, y así produce gran sufrimiento de la familia, así como del paciente.

Se han llevado a cabo varios ensayos en relación con el tratamiento del síndrome de Hunter, incluyendo el injerto de médula ósea, reemplazo de enzimas y terapia génica. Aunque el injerto de médula ósea es capaz de parar la mayoría de los síntomas, es difícil encontrar una coincidencia de HLA (antígeno leucocitario humano) para todos los pacientes. Además, un injerto de médula ósea es una operación quirúrgica mayor acompañada de varios efectos
45 adversos, incluyendo la puesta en alto riesgo de la vida del paciente si no hay coincidencia del HLA. La terapia génica para el síndrome de Hunter suministra un gen IDS normal en el cuerpo con la ayuda de un vector viral tal como adenovirus o retrovirus, o un vector no viral. Sin embargo, la terapia génica permanece como una técnica experimental, y no ha sido aplicada clínicamente. En cuanto al tratamiento de reemplazo enzimático para el síndrome de Hunter, administra la IDS producida externamente y tiene la ventaja de ser simple. Sin embargo, el reemplazo de enzimas debe llevarse a cabo continuamente, lo que se traduce en un coste elevado. El elaprase® (Shire Pharmaceuticals Group), producido usando tecnología de DNA recombinante, fue aprobado por la FDA como un tratamiento de reemplazo de enzimas para el síndrome de Hunter. Sin embargo, este medicamento es muy caro y adolece de las desventajas de ser de escaso efecto y poca seguridad.

55 El documento Muenzer, J. et al., Mol. Genet. METAB., Vol. 90, nº 3, marzo de 2007 (03 - 2007), pp. 329 - 337, muestra los resultados de un ensayo clínico de fase I/II de terapia de sustitución de enzimas en la

mucopolisacaridosis II (síndrome de Hunter). La enzima utilizada aquí, idursulfasa (Shire Human Genetic Therapies, Inc. Cambridge, MA), es una forma recombinante de iduronato-2-sulfatasa humana que tiene el alcance de modificación post-traducciona l de la cisteína 59 en formilglicina de aproximadamente el 50%.

- 5 Como se ha descrito anteriormente, aunque se han desarrollado varias terapias para el síndrome de Hunter, todavía existe una gran necesidad de una nueva terapia y agente que muestre una alta eficacia terapéutica con una seguridad elevada.

Descripción de la invención

Problema técnico.

- 10 Es un objeto de la presente invención superar los problemas encontrados en la técnica anterior y proporcionar una composición para la terapia del síndrome de Hunter, que comprende IDS recombinante como ingrediente activo, que garantiza una eficacia y seguridad terapéuticas elevadas, como se produce mejorando los procesos de cultivo y de purificación, y una formulación que comprende la misma.

- 15 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para preparar la composición para el tratamiento del síndrome de Hunter y la formulación que comprende la misma.

Solución al problema.

- 20 Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición para la terapia del síndrome de Hunter, que comprende como ingrediente activo una IDS que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, en donde el resto de cisteína en posición 59 se convierte en formilglicina (FGly) en una relación molar de 65% o superior, preferiblemente en una relación molar de 75% o superior, y más preferiblemente en una relación molar de 80% o superior.

- 25 La IDS, también llamada en el presente texto iduronato-2-sulfatasa o I2S, tiene un tamaño molecular de 56 kDa cuando es aislada y purificada a partir del hígado, riñón o placenta humanos (Bielicki, J. et al. (1990) *Biochem. J.*, 271: 75 -86). La IDS se expresa como una proteína monomérica de 550 aminoácidos y se segrega en el medio como una proteína activa madura de 525 aminoácidos después de la escisión del péptido señal de 25 aminoácidos. El peso molecular de la IDS varía con la glicosilación y se encontró que estaba en el intervalo de aproximadamente 60 a 90 kDa tras el tratamiento con endoglicosidasa F, medido mediante SDS-PAGE.

- 30 La IDS contiene dos enlaces disulfuro y ocho sitios de glicosilación ligada a N y se produce como una glicoproteína después de experimentar una modificación post-traducciona l en la que los sitios de glicosilación ligada a N están ocupados por complejo, híbrido y cadenas de oligosacáridos superiores del tipo de la manosa en eucariotas. Una vez segregada al medio de cultivo, la IDS se puede utilizar como fármaco después de pasar por los procesos típicos de aislamiento y purificación. La IDS puede estar en la forma de glicoproteínas con diversos patrones de glicosilación, dependiendo de diversos factores, incluyendo, por ejemplo, recombinación genética de IDS, transformación (por ejemplo, líneas celulares utilizadas), y técnicas de cultivo y purificación.

- 35 En esta invención, se describe que el contenido de manosa-6-fosfato (M6P) y la relación de conversión de Cys-59 en FGly tiene una gran influencia sobre la eficacia terapéutica y la seguridad de la IDS. La presencia de restos de manosa-6-fosfato (M6P) permite la unión específica de la enzima a receptores de M6P en la superficie celular, que conduce a la internalización celular de la enzima, la orientación de los lisosomas y el subsiguiente catabolismo de GAG acumulado. La actividad biológica de la IDS es también dependiente de una modificación posterior de la cisteína conservada (posición 59) para dar formilglicina.

- 40 A menos que se indique otra cosa, el término "IDS", como se usa en el presente texto, significa una proteína IDS unida a carbohidratos, es decir, una IDS glicosilada. La IDS de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

- 45 Como se usa en el presente texto, la expresión "patrón de glicosilación" de IDS se refiere al perfil de oligosacáridos unidos a los ocho sitios de glicosilación de la IDS resultante (por ejemplo, sitios de glicosilación y tipos de oligosacáridos).

- 50 En una realización, la IDS contenida en la composición para la terapia del síndrome de Hunter de acuerdo con la presente invención tiene la misma secuencia de aminoácidos que se conoce (SEQ ID NO: 1), pero tiene un patrón de glicosilación diferente y una diferente relación de conversión de cisteína en la posición 59 en formilglicina, como se describe anteriormente (véanse los Ejemplos 1 - 5 y 1 - 6).

- 55 Es decir, la IDS utilizada en la composición para la terapia del síndrome de Hunter de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con la conversión de cisteína en la posición 59 en formilglicina (FGly) a una relación molar de 65% o mayor, preferiblemente en una relación molar de 75% o mayor, y más preferiblemente en una relación molar de 80% o mayor, mientras que la relación de conversión en Elaprase es de aproximadamente 50% (Genet Med 2006: 8 (8): 465 - 473). Se sabe que la formilglicina está profundamente

implicada en la capacidad de IDS para degradar el sustrato, es decir la actividad de IDS. Por lo tanto, dado que la composición de la presente invención y el agente convencional Elaprasede son diferentes, la composición y la formulación de acuerdo con la presente invención pueden ostentar una mayor eficacia terapéutica para el síndrome de Hunter que el agente convencional Elaprasede debido a una mayor relación de conversión de citosina en formilglicina en la posición 59 en la secuencia de aminoácidos de IDS.

Además, la IDS usada en la composición o la formulación para la terapia del síndrome de Hunter de acuerdo con la presente invención contiene manosa-6-fosfato en una cantidad de 2,0 a 4,0 moles por mol de IDS, preferiblemente en una cantidad de 2,3 a 3,5 moles y más preferiblemente en una cantidad de 2,5 a 3,0 moles. El M6P desempeña un papel importante en la internalización celular de la IDS y posterior orientación a los lisosomas intracelulares. Por tanto, la formulación de la presente invención que comprende IDS con un alto contenido de M6P garantiza el alto rendimiento del mecanismo de absorción mediada por receptor para esta enzima y la orientación a los lisosomas, lo que tiene por resultado en un catabolismo efectivo de GAG acumulado.

La formulación para la terapia del síndrome de Hunter que comprende IDS de acuerdo con la presente invención puede ser preparada formulando la composición de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una forma adecuada.

Tal como se utiliza en el presente texto, la expresión " portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo no tóxico, fisiológicamente compatible para el ingrediente activo, que es adecuado para la ingestión por los animales, sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica y similares.

La composición de acuerdo con la presente invención se puede formular con un vehículo adecuado dependiendo de la vía de administración adoptada. La formulación de acuerdo con la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral pero esto no se limita a estas vías. Para la administración parenteral, puede adoptarse una ruta seleccionada entre transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intravenosa.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en combinación con un vehículo oral adecuado en polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y obleas utilizando un método conocido en la técnica. Los ejemplos de vehículo adecuado útiles en la formulación incluyen azúcares tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol, almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidones de patata, celulosas tales como celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, e hidroxipropil metil celulosa, y cargas tales como gelatina y polivinilpirrolidona. Opcionalmente, la formulación puede comprender además un agente desintegrante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o alginato sódico. Además, también puede emplearse un agente antiaglomerante, un lubricante, un agente humectante, una fragancia, un emulsionante, y un conservante.

También, la composición de la presente invención se puede formular en combinación con un vehículo parenteral en una forma de dosificación parenteral como un preparado inyectable, un preparado transdérmico o una inhalación intranasal utilizando un método bien conocido en la técnica. Para su uso en inyección, la formulación debe ser esterilizada y protegida de la contaminación con microorganismos tales como bacterias y hongos. Los ejemplos de vehículo adecuados para inyección pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, agua, etanol, polioli (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), combinaciones de los mismos, y/o un disolvente o un medio de dispersión vegetal que contiene aceite. Más preferiblemente, el vehículo puede ser una solución isotónica tal como solución de Hank, solución de Ringer, PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contiene trietanolamina o agua estéril para inyección, 10% de etanol, 40% de propilenglicol y 5% de dextrosa. Con el fin de proteger el preparado inyectable de la contaminación microbiana, puede comprender además un agente antibacteriano y antifúngico tal como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, etc. También, los preparados inyectables pueden comprender además, en la mayoría de los casos, un agente isotónico tal como azúcar o cloruro sódico. Estas formulaciones se describen en un documento bien conocido en el campo farmacéutico (Remington's Pharmaceutical Science, 15ª edición, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania). En cuanto a la inhalación, la formulación de acuerdo con la presente invención se puede suministrar convenientemente en forma de una pulverización en aerosol desde un envase o pulverizador a presión usando un propulsor adecuado, tal como diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono o un gas adecuado. En el caso de un aerosol comprimido, el tamaño unitario de una dosis se puede determinar mediante una válvula para suministrar una cantidad medida. Por ejemplo, se pueden formular cápsulas de gelatina y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón para estos sistemas.

Otros vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995.

Además, la formulación de acuerdo con la presente invención puede comprender también uno o más tampones (por ejemplo, solución salina o PBS), hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextrano), estabilizantes (hidrógeno sulfito sódico, sulfito sódico o ácido ascórbico), antioxidantes, agentes bacteriostáticos, agentes quelantes (por ejemplo, EDTA o glutatión), coadyuvantes (por ejemplo hidróxido de aluminio), agentes de suspensión, espesantes y/o conservantes (cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno y clorobutanol).

También, la composición de la presente invención puede formularse en una forma de dosificación que permite la liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de ser administrado a mamíferos. Una cantidad eficaz de la formulación así preparada puede ser administrada por distintas vías incluyendo las vías oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa e intramuscular. La expresión "cantidad eficaz" como se usa en el presente texto se refiere a una cantidad de IDS que permite trazar el diagnóstico o el efecto terapéutico que tenga lugar cuando se administre a un paciente. La dosis de la formulación según la presente invención puede variar dependiendo de varios factores entre los que se incluyen la vía de administración, el tipo de sujeto que se ha de tratar, el tipo de enfermedad a tratar, la vía de administración, la gravedad de la enfermedad, y la edad, sexo, peso, condición y estado de salud del paciente. La formulación que comprende IDS según la presente invención se puede utilizar en una dosis de 0,1 a 10 mg/kg y preferiblemente a una dosis de 0,5 -1,0 mg/kg por dosis.

El método para preparar la composición terapéutica de acuerdo con la presente invención comprende:

- (1) cultivar una cepa de células recombinantes transformadas con un gen que codifica IDS representada por SEQ ID NO: 1 y obtener el cultivo; y
- (2) purificar el cultivo mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad,

en donde la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo usando un tampón de elución con un pH de 4,0 a 6,0.

Más concretamente, el método para preparar la composición terapéutica de acuerdo con la presente invención comprende:

- (1) transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que lleva un gen de IDS para obtener una cepa de células recombinantes;
- (2) cultivar la cepa de células recombinantes en presencia de un hidrolizado en un medio libre de suero y obtener el cultivo;
- (3) purificar la IDS procedente del cultivo por medio de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad, realizándose dicha cromatografía de intercambio catiónico utilizando un tampón de elución con un pH en el intervalo de 4,0 a 6,0; y
- (4) combinar la IDS purificada con un portador farmacéuticamente aceptable.

En el método, la etapa (1) se dirige a establecer una cepa de células recombinantes introduciendo un vector de expresión que lleva un gen de IDS en una célula hospedadora. Son conocidos en la técnica la secuencia de aminoácidos de IDS y un gen que codifica IDS. Se prefiere un gen que codifica IDS que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, pero no se proporciona como ejemplo limitante. Si una secuencia de aminoácidos mantiene la actividad de IDS que se desea provocar por el propósito de la presente invención, aunque mutada por inserción, delección y/o sustitución de algunos restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, su gen puede usarse en la presente invención. El vector de expresión que lleva el gen puede construirse usando un método típico conocido en la técnica. Además, el vector de expresión puede contener un gen marcador que permite la introducción del gen que ha de ser identificado. Los ejemplos de gen marcador incluyen un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr), pero no se limitan a este. Es preferible un vector pJK-dhfr-O2-IDS (Fig. 2).

Las células hospedadoras disponibles para la etapa (1) pueden ser células de animales, y sus ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellas, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK), células de riñón de cría de hamster (BHK), células de riñón de mono 7 (COS7), y las células NSO, con una preferencia por las células CHO. Las líneas de células CHO son de las más utilizadas en la preparación de productos biomédicos, gracias a sus altas tasas de crecimiento de células y a su productividad, facilidad de manipulación genética, la rápida proliferación en cultivos en suspensión a gran escala y la alta adaptación a un medio libre de proteína. La transformación en la etapa (1) se puede llevar a cabo de acuerdo con un protocolo conocido en la técnica.

En el método, la etapa (2) se dirige a cultivar la cepa de células recombinantes anclando el vector de expresión de IDS en el mismo en un medio libre de suero. El cultivo se puede llevar a cabo en un medio y bajo condiciones optimizadas para el tipo de célula hospedadora. Se prefiere un medio libre de suero. Estando libres de suero (por ejemplo, sueros bovinos), dichos medios evitan la probabilidad de inducir los efectos secundarios o los riesgos asociados con los sueros.

El cultivo de la cepa de células recombinantes transformadas con un vector de expresión de IDS se puede escalar a mayor nivel. Por ejemplo, la cepa de células recombinantes de la presente invención puede cultivarse en un matraz agitador y luego puede escalarse hasta cientos de miles de litros en un biorreactor. La etapa de cultivo se lleva a cabo en presencia de un hidrolizado, que tiene una influencia importante en la determinación del contenido de formilglicina. Preferiblemente, el hidrolizado se añade en una cantidad tal como para formar una concentración final

de 0,1 ~ 10,0 g/L. El hidrolizado útil en la presente invención puede ser el obtenido hidrolizando un material animal o vegetal. Más en particular, el hidrolizado se puede obtener hidrolizando al menos un material elegido entre el grupo que consiste, pero sin limitarse a ellos, en soja, patata, germen de trigo y levadura.

- 5 En el método, la etapa (3) se dirige a la purificación de la IDS procedente del cultivo celular mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad.

10 Preferiblemente, los cuatro procesos cromatográficos se pueden realizar en ese orden. Sin embargo, debe ser evidente para un experto en la técnica que el orden se puede cambiar en caso necesario. Junto con el orden de los procesos cromatográficos, las resinas y los valores del pH de los tampones de elución son importantes para determinar el patrón de glicosilación y el contenido de formilglicina de la IDS.

La cromatografía de intercambio aniónico está destinada a eliminar colorantes y diversas impurezas del cultivo celular y se lleva a cabo en una columna rellena con resinas de Q Sepharose® utilizando un tampón de elución con un pH de 5,5 a 7,5.

- 15 La cromatografía hidrofóbica está destinada a eliminar los colorantes y las impurezas que quedan después de la cromatografía de intercambio aniónico. Se lleva a cabo en una columna rellena con resinas de fenilo Sepharose®, utilizando un tampón de elución a un pH de 5,0 - 7,0.

20 La cromatografía de intercambio catiónico está destinada a seleccionar un alto contenido de formilglicina y eliminar las impurezas restantes. Se lleva a cabo en una columna rellena con resinas de intercambio catiónico, utilizando un tampón de elución con un pH de 4,0 a 6,0. Los ejemplos de resinas de intercambio catiónico útiles en la presente invención pueden incluir CM Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow, S Sepharose Fast Flow y Capto MMC, todos de GE Healthcare, pero no se limitan a estas resinas. Preferiblemente, el tampón de elución está en el intervalo de pH de 4,0 a 6,0.

25 La cromatografía de afinidad está destinada a eliminar el glicerol utilizado en la cromatografía de intercambio catiónico y concentrar el volumen de los eluatos. Se lleva a cabo en una columna rellena con resinas de Blue Sepharose™, usando un tampón de elución con un pH de 6,0 a 8,0.

Las condiciones de cada tipo de cromatografía pueden ser optimizadas por un experto en la materia. Con respecto a las condiciones de cromatografía en concreto, se puede hacer referencia al ejemplo 1-5 que se describe más adelante.

- 30 El método para preparar la composición que comprende IDS como ingrediente activo de acuerdo con la presente invención puede comprender además inactivar los virus que se pueden incorporar en la composición. La inactivación puede llevarse a cabo de diversas maneras, y preferiblemente manteniendo el cultivo a pH 3,0 ~ 4,0 o bajo unas condiciones de pH alto para un tiempo predeterminado. El proceso de inactivación puede realizarse durante el proceso de purificación, preferiblemente durante la cromatografía, y más preferiblemente entre la cromatografía hidrofóbica y la cromatografía de intercambio catiónico.

Después de los procesos cromatográficos, la fracción activa así obtenida puede ser concentrada y filtrada, para dar IDS que puede usarse como ingrediente activo de la composición farmacéutica.

La composición puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable y formularse en una forma de dosificación adecuada.

- 40 La composición que comprende la IDS, preparada por el método de acuerdo con la presente invención, tiene ventajas sobre las composiciones de IDS convencionales de la forma siguiente: 1) ejerce una mayor eficacia farmacéutica gracias a un mayor contenido de formilglicina, 2) puede catabolizar de manera más eficaz el GAG acumulado en los lisosomas, 3) está libre de suero derivado de animales, y por tanto es seguro, y 4) es seguro y eficaz gracias a su pureza de 99,9% o mayor.

45 **Efectos ventajosos de la invención.**

La composición que comprende la IDS recombinante y la formulación que comprende a ésta de acuerdo con la presente invención son superiores en eficacia farmacéutica y seguridad al agente convencional Elapraxe y por lo tanto se puede utilizar eficazmente para la terapia del síndrome de Hunter.

Breve descripción de los dibujos.

- 50 La FIG.1 es una vista que ilustra un esquema para la construcción del vector pjk-dhfr-IDS-S1 utilizado para construir un vector de expresión de IDS.

La FIG. 2 es una vista que ilustra un esquema para la construcción del vector de expresión de IDS pjk-dhfr-Or2-IDS a partir del pjk-dhfr-IDS-S1 de la FIG. 1.

La FIG. 3 es un diagrama de flujo que ilustra el aislamiento y la purificación de IDS partir de CHO-DG44 transformado.

5 La FIG. 4 es una fotografía que muestra un resultado de SDS-PAGE de IDS para analizar la secuencia N-terminal, en donde un marcador se desarrolla en la calle M, IDS glicosilada en la calle 1, PNGasa F en la calle 2, e IDS desglucosilada en la calle 3.

La FIG. 5 es un diagrama de flujo que ilustra el proceso de análisis de la secuencia de aminoácidos de IDS.

La FIG. 6 es una vista que muestra la secuencia de aminoácidos de la IDS de la presente invención analizada por MALDIMS /MS y LC-ESI-MS/MS.

10 La FIG. 7 es un cromatograma de RP-HPLC de muestras de IDS no reducidas y reducidas mostrando la posición de enlaces disulfuro en IDS.

La FIG. 8 es una vista mostrando las posiciones de los enlaces disulfuro en la IDS de la presente invención analizada por MALDI-MS.

15 La FIG. 9 es una vista que muestra las posiciones de los enlaces disulfuro en la IDS de la presente invención tal como se analiza por MALDI-MS/MS.

La FIG. 10 es una vista que indica las posiciones de los enlaces disulfuro en la IDS de la presente invención, obtenida por medio de MALDI-MS/MS.

La FIG. 11 es una fotografía que muestra IDS desarrollada por SDS-PAGE después del tratamiento con diversas enzimas glicósido hidrolasa para examinar la glicosilación de la ID de la presente invención.

20 La FIG. 12 es de cromatogramas HPAEC-PAD mostrando el contenido de manosa-6-fosfato en la IDS de la presente invención.

La FIG. 13 es un cromatograma de exclusión por tamaño que muestra la pureza de la IDS de la presente invención.

La FIG. 14 es un cromatograma iónico que muestra la actividad catalítica de la IDS de la presente invención en un sustrato natural.

25 La FIG. 15 es la representación de Lineweaver-Burk mostrando relaciones de cantidades de absorción celular de IDS relativa a la cantidad de IDS añadida a células de fibroblastos normales.

La FIG. 16 es un gráfico que muestra la cantidad de la IDS de la presente invención que se internaliza en células de fibroblastos humanas normales y células de pacientes que sufren síndrome de Hunter.

La FIG. 17 es una vista que muestra medidas del contenido de formilglicina en la ID de la presente invención.

30 La FIG. 18 es una vista que muestra puntos de IEF (enfoque isoeléctrico) de la IDS de la presente invención antes y después de cromatografía de intercambio catiónico en donde M se desarrolla en el carril M, una muestra cargada para cromatografía de intercambio catiónico en el carril 1, un eluato de cromatografía de intercambio catiónico en el carril 2, y una solución de regeneración después de la cromatografía de intercambio catiónico en el carril 3.

Modo para la invención.

35 Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos que se exponen como ilustración, pero que no se deben considerar limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1: Preparación de IDS.

<1-1> Adquisición del gen.

40 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana como se ha descrito con anterioridad [S. Beckebaum et al., *Immunology*, 2003, 109: 487 - 495]. El RNA total se extrajo de la PBMC de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente [M. J. Holland et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1996, 105: 429 - 435]. Con el fin de construir una biblioteca de cDNA del RNA total, el DNAc de cadena simple se sintetizó usando cebador oligo (dT) con la ayuda de un kit de síntesis monocatenaria (Boehringer Mannheim). En relación con esto, se añadió
45 agua destilada tratada con DEPC a un tubo de Eppendorf que contiene 1 µg del RNA total con el fin de formar un volumen final de 12,5 µl. Después se añadió al tubo 1 µg de cebador oligo (dT) de 20 pmol, seguido de incubación a 70 °C durante 2 min y enfriamiento. A esta mezcla de reacción se añadieron 4 µg de un tampón de reacción, 1 µg de dNTP, 1 µg de un inhibidor de RNasa, y 1 µg de transcriptasa inversa, que después se hacen reaccionar a 42 °C durante una hora para sintetizar cDNA de cadena simple. La PCR se realizó en el cDNA como plantilla en presencia de cebadores de SEQ ID NOS: 2 a 4 para amplificar un gen de IDS humana. En este contexto, cada cebador se
50 diseñó para contener un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para su uso en la clonación de genes.

<1-2> Construcción del vector de expresión.

A. Construcción del vector pJK-dhfr-IDS-S1.

5 Una secuencia señal de cadena ligera de un anticuerpo (derivada de una parte de la cadena ligera de la IgG humana) como secuencia no codificadora se introdujo en el extremo 5' del gen de IDS adquirido por el Ejemplo <1-1> antes de la PCR. Después de que el producto de la PCR obtenido así se desarrolló en gel por electroforesis, el gen de IDS humana fue aislado usando un kit de extracción en gel. El gen de IDS aislado y el vector pJK-dhfr-Or2 (Aprogen) fueron digeridos con EcoRV y Apal y se ligaron entre sí a 16 °C durante 20 horas. El vector recombinante así construido se transformó en *E. coli* (DH5a) que se extendió después sobre una placa de LB que contiene 50 µg/mL de ampicilina y se incubó durante la noche. Las colonias desarrolladas en las placas se seleccionaron y se cultivaron para aislar el plásmido de las mismas (Fig. 1).

B. Construcción del plásmido de expresión de IDS recombinante humano.

15 Para cambiar la secuencia no codificante del plásmido construido anteriormente a una secuencia señal, la IDS humana recombinante se subclonó a un vector pJK-dhfr-or2. Con este fin, el vector pJK-dhfr-IDS-S se digirió con EcoRV y Apal para dar un gen de IDS parcial (1233 pb) que después fue insertado en el vector pJK-dhfr-Or2 previamente tratado con las mismas enzimas de restricción, para construir un vector pJK-dhfr-IDS-S2. Con el fin de introducir una secuencia no codificante y una secuencia señal en el extremo 5', se utilizó un cebador directo IDS N1 (SEQ ID NO: 5) y un cebador inverso IDS 4 (SEQ ID NO: 7) para PCR sirviendo como molde el vector pJK-dhfr-IDS-S. Después de empezar a 94 °C durante 5 min, se realizó la PCR con 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 30 seg y 72 °C durante 40 seg y se acabó por extensión a 72 °C durante 10 min.

20 La amplificación por PCR dio un gen parcial de IDS que era de 448 pb. Este gen se usó como plantilla para la PCR que se realizó de nuevo en presencia de un cebador directo IDS N2 (SEQ ID NO: 6) y un cebador inverso IDS 4 (SEQ ID NO: 7) bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Esto dio como resultado la síntesis de un fragmento de DNA de 476 pb de longitud.

25 Posteriormente, el vector pJK-dhfr-IDS-S2 y el fragmento de gen humano recombinante (476 pb) fueron digeridos por separado con EcoRV. Los materiales digeridos se separaron en gel por electroforesis para obtener el vector y el fragmento de IDS de 476 pb de longitud. Este vector y este inserto se ligaron a 16 °C durante 12 horas en presencia de DNA ligasa T4 para construir el plásmido pJK-dhfr-Or2-IDS. Estos procedimientos se ilustran en FIG. 2.

30 Para confirmar la construcción del plásmido de expresión IDS, el DH5 se transformó con pJK-dhfr-Or2-IDS y se cultivó durante 24 horas en una placa de LB que contiene ampicilina (50 µg/mL). De las colonias así formadas, fue aislado un plásmido y digerido para medir el tamaño del inserto. Además, se llevó a cabo la secuenciación de bases utilizando un cebador T7 (SEQ ID NO: 8).

<1-3> Selección de la cepa de expresión de IDS humana recombinante.

A. Transfección de CHO-DG44.

35 Se usó CHO-DG44 como célula hospedadora para expresar la IDS de la presente invención. La célula de ovario de hámster chino mutante CHO-DG44 lleva una doble delección para el gen de dhfr (dihidrofolato reductasa) endógeno que codifica la enzima DHFR. La enzima DHFR está implicada en la conversión de folato a través de dihidrofolato (FH2) en tetrahidrofolato (FH4) que está implicado en la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos. El nivel de dhfr en las células depende de la concentración de MTX. El MTX, que es estructuralmente similar al ácido fólico, un sustrato de DHFR, compete con el ácido fólico para la unión de dihidrofolato reductasa, de modo que la mayor parte de la dihidrofolato reductasa pierde su actividad en presencia de MTX. Por tanto, si las células no amplifican una cantidad suficiente de dhfr, mueren a causa de que no pueden sintetizar los ácidos nucleicos necesarios para su vida. En cambio, si la amplificación es suficiente, las células pueden sobrevivir bajo una alta concentración de MTX porque son relativamente abundantes en dhfr. Este sistema puede aplicarse a células animales para seleccionar una línea celular transfectada que puede amplificar el gen dhfr y por tanto un gen estructural de interés.

Con este fin, se introdujo un gen dhfr como marcador amplificable en el vector de expresión de IDS pJK-dhfr-Or2-IDS, construido en el Ejemplo 1-2, y se realizó la amplificación de genes utilizando MTX y el gen dhfr.

40 A este respecto, la línea celular DG44 (obtenida del Dr. Chaisin, Universidad de Columbia) se suspendió en 10 mL de DMEM/F12 (suplementado con nucleótidos y nucleósidos, y 10% de suero bovino fetal (FBS)) y se recolectó centrifugando a 1000 rpm durante 5 min. Las células se inocularon en 50 mL de un medio de cultivo en un matraz T-175 y se incubaron a 37 ± 1 °C en una incubadora con 5 ± 1 % de CO₂. Un día antes de la transfección, el medio de cultivo para las células DG44 se retiró del matraz T-175 y las células se lavaron dos veces con PBS y se desprendieron mediante tripsinización. Después se sembraron a una densidad de 5 x 10⁵ células en un matraz T-25 y se cultivaron a 37 ± 1 °C durante 24 horas en una incubadora con 5 ± 1 % de CO₂. La contaminación bacteriana o fúngica se examinó bajo un microscopio óptico mientras se realizó PCR-ELISA para examinar si las células estaban contaminadas con micoplasma.

5 Las células DG-44 libres de gérmenes fueron transfectadas con el vector de expresión de IDS pJK-dhfr-Or2-IDS, construido en el Ejemplo 1-2, utilizando un kit de Lipofectamina. A este respecto, 5 µg del vector de expresión y 50 µg de Lipofectamina fueron diluidos por separado en 800 µg de Opti-MEM I, se mezclaron cuidadosamente para no formar burbujas, y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Mientras tanto, las células DG44 se lavaron una vez con PBS estéril y tres veces con Opti-MEM I. A las células DG44 se añadió cuidadosamente la mezcla de DNA-lipofectamina y luego 6,4 mL de Opti-MEM antes de la incubación a 37 ± 1 °C durante 5 horas en un incubador con 5 ± 1 % de CO₂. A continuación, se llevó a cabo la incubación durante 48 horas más en el medio suplementado con 8 mL de DMEM/F12 y 1,6 mL de FBS para promover la recuperación de las membranas celulares y el crecimiento de las células.

B. Selección de cepa de células resistentes a la geneticina (G418).

15 Las células cultivadas fueron desprendidas con 0,25% de tripsina, se contaron y se sembraron a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos que contienen 100 µg de medio MEM-alfa (suplementado con 10% de FBS dializado y 550 µg/mL de G418) por pocillo. Al día siguiente, se añadió el mismo medio en una cantidad de 100 µg/pocillo y las células se cultivaron durante 2 - 3 semanas para formar colonias. Cuando las células se desarrollaron a 50% de confluencia, el medio se reemplazó con uno fresco. Después de mantenimiento durante 3 días, se recogieron los medios de cultivo para el análisis enzimático.

20 El medio se reemplazó con 200 µg de un medio fresco cada tres días. En el día 3 ~ 4 después del cultivo, las células no transfectadas, es decir, células que no eran resistentes a la geneticina, empezaron a desprenderse del fondo de las placas de 96 pocillos cuando se observan con un microscopio óptico. Los clones seleccionados se cultivaron mientras eran transferidos secuencialmente de las placas de 96 pocillos a placas de 24 pocillos, placas de 6 pocillos y platos de 100 mm por orden. Cuando las células crecieron a 80 ~ 90% de confluencia en platos de 100 mm, se midió de nuevo el nivel de expresión. Las células fueron desprendidas con 0,25% de tripsina, se contaron y se sembraron en placas a una densidad de 5×10^5 células/pocillo/3 mL en placas de 6 pocillos, se mantuvieron durante 25 3 días y se contaron. El nivel de expresión de la proteína se analizó cuantitativamente. De acuerdo con los resultados del análisis, se seleccionaron 15 clones.

C. Selección de la cepa de expresión de IDS con capacidad de expresión elevada.

Los 15 clones seleccionados se cultivaron a una concentración de MTX en aumento para seleccionar cepas de células en las que se amplificó la IDS.

30 En este contexto, se inocularon las células a una densidad de 1×10^6 células/ placa de 100 mm /10 ml de un medio que contiene MTX y se cultivaron a un 80 ~ 90% de confluencia. Una décima parte del volumen del cultivo de células se inoculó de nuevo en platos de 100 mm/10 mL. Este proceso de subcultivo se repitió dos veces. Se dejó que las células experimentasen al menos tres pasajes de modo que se adaptaron suficientemente a concentraciones de MTX aumentadas. Se aumentó la concentración de MTX, desde 5 nM para los clones seleccionados después de realizar un análisis para los tres primeros días, a 20 nM. En cada etapa, los clones adaptados al aumento de la concentración de MTX se cultivaron durante tres días para medir las tasas de crecimiento celular. Se midieron los niveles de expresión de IDS para seleccionar cepas de células en las que tuvo lugar la amplificación del gen de IDS, es decir, cepas celulares en las que la IDS recombinante se expresó a una tasa elevada. De las cepas de células seleccionadas, se utilizó NI4 en experimentos subsiguientes porque tenía el nivel de expresión más alto.

40 D. Selección de la cepa individual por dilución limitante.

No había posibilidad de que la cepa NI4 se pudiese haber mezclado con otras cepas. Por lo tanto, la cepa se separó en una sola cepa. Los clones NI4 que sobrevivieron a MTX 20 nM se subclonaron mediante dilución limitante con el fin de seleccionar una cepa de células deseada.

45 En primer lugar, se inoculó NI4 a una densidad de 0,5 células/pocillo en un medio de IMDM (Gibco BRL, n° Cat 12200) en placas de 96 pocillos, y se cultivó reponiéndose el medio cada tres días. En el día tres, las placas se observaron bajo un microscopio para excluir los pocillos en los que se habían formado dos o más colonias por pocillo. Los pocillos en los que se había formado sólo una colonia por pocillo fueron seleccionados y se siguió cultivándolas. Después de cultivar durante 15 días, se pasaron las células a placas de 96 pocillos y cuando las células habían crecido al 90% de confluencia, el medio se repuso con medio fresco.

50 Se identificó un total de 263 cepas individuales a partir de la cepa NI4. De ellas, se encontró que la cepa S46 tenía la más alta actividad de IDS y se la denominó NI4-S46.

<1-4> Cultivos de células.

A. Cultivo en matraz agitado.

55 La cepa NI4-S46 se cultivó a gran escala para producir la IDS de la presente invención. La cepa se inoculó en un medio libre de suero EX-cell 302 (que contiene glutamina, sulfato de dextrano, y pluronic F-68) en frascos de cultivo de 125 mL, y se cultivaron a 37 ± 1 °C en un incubador con 5 ± 1 % de CO₂. Posteriormente, las células se

sometieron a pasaje a una relación de 1 : 5 ~ 1 : 8 cada dos o tres días utilizando matraces de agitación. Tras el pasaje, el volumen de cultivo se aumentó gradualmente hasta aproximadamente 2.400 mL. En muchos matraces de agitación, las células se cultivaron a un nivel suficiente para ser inoculadas en un fermentador.

5 B. Cultivo en fermentador de 30 L (volumen de trabajo 20 L).

10 Cuando la densidad de las células en los matraces de agitación alcanzó $1,3 \times 10^6$ células/mL, se inocularon en un fermentador de 30 L. Durante el cultivo de las células, las condiciones de cultivo se mantuvieron con un contenido de oxígeno disuelto del 10% o superior, una temperatura de cultivo de 37 ± 1 °C y un pH de $7,0 \pm 0,2$. En caso necesario, se tomaron muestras de células y se observaron bajo un microscopio. El cultivo celular se examinó para analizar el recuento de células, la viabilidad celular, el pH, la concentración de glucosa y la concentración de glutamina. Basándose en los resultados del análisis, cuando se decidió que las células estaban suficientemente desarrolladas, las células se inocularon en un fermentador de 150 L.

C. Cultivo en fermentador de 150 L (volumen de trabajo 100 L).

15 Cuando las células del fermentador de 30 L alcanzaron una densidad de $0,9 \times 10^6$ células/mL o más, se inocularon en un fermentador de 150 L. Durante el cultivo de células, las condiciones de cultivo se mantuvieron en un contenido de oxígeno disuelto del 10% o superior, una temperatura de cultivo de 37 ± 1 °C y un pH de $7,0 \pm 0,2$. En caso necesario, se tomaron muestras de células y se observaron bajo un microscopio. El cultivo de células se examinó para analizar el recuento, la viabilidad celular, el pH, la concentración de glucosa y la concentración de glutamina. Sobre la base de los resultados del análisis, cuando se decidió que las células estaban suficientemente desarrolladas, las células se inocularon en un fermentador de 650 L.

D. Cultivo en fermentador de 650 L (volumen de trabajo 500 L).

20 Cuando las células del fermentador de 150 L alcanzaron una densidad de $0,9 \times 10^6$ células/mL o más, fueron inoculadas en un fermentador 650 L. Durante el cultivo de células, las condiciones de cultivo se mantuvieron en un contenido de oxígeno disuelto del 10% o superior, una temperatura de cultivo de 34 ± 1 °C y un pH de $6,9 \pm 0,2$ durante tres días, y luego a una temperatura de cultivo de 32 ± 1 °C y un pH de $6,9 \pm 0,2$. En caso necesario se tomaron muestras de células y se observaron bajo un microscopio para analizar el recuento de células, la viabilidad de las células, el pH, las concentraciones de glucosa y las concentraciones de glutamina. Dependiendo del resultado del análisis, se ajustaron concentraciones de glucosa y glutamina para continuar el desarrollo celular. Durante la fermentación se añadió un hidrolizado para aumentar la conversión a formilglucina.

30 <1-5> Purificación de IDS.

Se aisló IDS a partir del cultivo de células utilizando una serie de los cuatro procesos cromatográficos siguientes.

A. Recolección y filtración del medio de cultivo.

35 Cuando la viabilidad celular se mantuvo en el intervalo de 80 ~ 85% 10 días después de la inoculación en el fermentador de 650 L, el cultivo fue detenido. Las células se recolectaron a partir del cultivo mediante el sistema de filtro Millipore POD y el filtro D0HC (Millipore) a una presión de 0,9 bar o menos. Después haber sido eliminadas las células, el sobrenadante se filtró a través de un pre-filtro (Millipore, $0,5 + 0,2$ µm) y un filtro de $0,45 + 0,2$ µm, y se recuperó en una bolsa de vinilo estéril desechable. La solución del cultivo recogido se almacenó a $2 \sim 8$ °C.

B. Concentración y diafiltración.

40 El filtrado recuperado en A se concentró aproximadamente 10 veces utilizando un sistema de ultrafiltración (Tangential Flow Filtration Membrane System: sistema de membrana de filtración en flujo tangencial). La membrana (valor de corte: 30 K, Pall) instalada dentro del sistema de ultrafiltración se lavó con WFI (agua para inyección) a un caudal de 20 ~ 25 L/min y después se equilibró con un tampón (pH 7,0 ~ 8,0) que contiene fosfato sódico 20 mM (dihidrógeno fosfato sódico monohidrato e hidrógeno fosfato sódico heptahidrato). Después del equilibrado, el filtrado se alimentó en la membrana mientras se recuperan las fracciones que no pasan la membrana. Una vez que el volumen recuperado llegó a ser aproximadamente 1/10 del volumen inicial del filtrado, se detuvo el procedimiento de concentración. El tampón se intercambiaba consecutivamente en un volumen de tres a cuatro veces mayor que el del concentrado. Si la conductividad y el pH caen dentro de los criterios, se detiene el proceso. [Criterios: conductividad = 5,0 mS/cm, pH 7,0 ~ 8,0].

C. Cromatografía de intercambio aniónico.

50 Para eliminar colorantes y diversas impurezas del concentrado recuperado en B, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico en una columna (GE Healthcare) rellena con resinas Q Sepharose (GE Healthcare). La columna se equilibró con tampón de equilibrado (pH 7,0 ~ 8,0) que contiene fosfato sódico 20 mM (dihidrógeno fosfato sódico monohidrato e hidrógeno fosfato sódico heptahidrato). El concentrado obtenido en B se filtró a través de un filtro de $0,45 + 0,2$ µm (Sartorius) y se cargó a una velocidad de flujo de 100 ~ 120 cm/h en la columna equilibrada. Una vez terminada la carga, la columna se lavó en primer lugar con el tampón de equilibrado y luego

55

con tampón de lavado (pH 5,5 ~ 7,5) que contiene cloruro sódico. Posteriormente, se eluyó una proteína diana con un tampón de elución (pH 5,5 ~ 7,5) que contiene cloruro sódico.

D. Cromatografía hidrofóbica.

- 5 Para eliminar los colorantes e impurezas que quedaron después de la cromatografía de intercambio aniónico, se realizó la cromatografía hidrofóbica en una columna (GE Healthcare) rellena con resinas de fenil Sepharose (GE Healthcare). La columna se equilibró con tampón de equilibrado (pH 5,0 ~ 7,0) que contiene cloruro sódico. El eluato obtenido en C se filtró a través de un filtro de 0,45 + 0,2 μ m (Sartorius) y se cargó a un caudal de 70 ~ 100 cm/h en la columna equilibrada. Una vez terminada la carga, la columna se lavó con el tampón de equilibrado.
- 10 Posteriormente, se eluyó una proteína diana con un tampón de elución (pH 5,0 ~ 7,0) que contiene glicerol.

E. Inactivación de virus a bajo pH.

- Los virus que pueden derivarse de células hospedadoras o cualquier material usado en los procesos llevados a cabo fueron inactivados mediante una condición de pH bajo. En este sentido, el eluato obtenido en D se mantuvo durante 2 horas a un pH 3,0 ~ 4,0 para lo cual se ajustó su acidez con ácido acético al 25%. A continuación, el pH del eluido se aumentó a 4,0 ~ 5,0 usando hidróxido de sodio 0,5 M para su uso en el siguiente proceso. La inactivación a bajo pH se llevó a cabo a 12 ± 2 °C.
- 15

F. Cromatografía de intercambio catiónico.

- La IDS es glicoproteína con oligosacáridos, y existe como un isómero que tiene un punto isoeléctrico diferente de acuerdo con el contenido de ácido siálico en el extremo de la cadena de glicano. Como los oligosacáridos con una carga negativa, el ácido siálico muestra una diferencia en términos del grado de unión a la resina de intercambio catiónico de acuerdo con el contenido de ácido siálico. Usando esta caracterización, se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico para obtener IDS que muestra una alta actividad (un alto contenido de formilglicina) con un alto contenido de ácido siálico y para eliminar otras impurezas [impureza del producto (IDS agregada, IDS procesada), la impureza de proceso (proteína de la célula hospedadora)]. En detalle, una columna rellena con resinas de intercambio catiónico MMC Capto™ (GE Healthcare) fue equilibrada con tampón de equilibrado con glicerol añadido (pH 4,0 ~ 5,0). El eluato inactivado obtenido en E se filtró a través de un filtro de 0,45 + 0,2 μ m (Sartorius) y se cargó a un caudal de 100 ~ 120 cm/h en la columna equilibrada. A continuación la columna se lavó con el tampón de equilibrado, seguido por la elución con tampón de elución con glicerol añadido (pH 4,0 ~ 6,0) para dar IDS con un elevado contenido en ácido siálico (punto isoeléctrico 3,5 o menos), de alta actividad (contenido de formilglicina: $80 \pm 15\%$) y pureza elevada (SE-HPLC, 98% o superior).
- 20
- 25
- 30

G. Cromatografía de afinidad.

- La cromatografía de afinidad (Blue Sepharose, GE Healthcare) se llevó a cabo para eliminar el glicerol usado en la cromatografía de intercambio catiónico y para reducir el volumen del eluato. El eluato obtenido en F se filtró a través de un filtro de 0,45 + 0,2 μ m (Sartorius) y se cargó a una velocidad de flujo de 100 ~ 120 cm / h en una columna rellena con resina Blue Sepharose (GE Healthcare) que previamente fue equilibrada con tampón de equilibrado de glicerol añadido (pH 4,5 ~ 5,5). Después de la terminación de la carga, la columna se lavó con tampón de lavado (pH 4,5 ~ 5,5) y la proteína diana se eluyó con tampón de elución (pH 6,0 ~ 8,0).
- 35

H. Concentración e intercambio de tampón.

- Se usó un sistema de ultrafiltración (Tangential Flow Filtration Membrane System) para ajustar la concentración de proteína del eluato obtenido en G y para intercambiar el tampón de la proteína purificada con tampón de formulación. La membrana (valor de corte: 10 K, Pall) instalada en el interior del sistema de ultrafiltración se lavó con WFI (agua para inyección) a un caudal de 450 ~ 650 mL /min y luego se equilibró con un tampón de formulación (2,25 g/L de dihidrógeno fosfato sódico monohidrato, 0,99 g/L de hidrógeno fosfato sódico heptahidrato, 8 g/L de cloruro sódico, pH 6,0 ~ 7,0) sin polisorbato 20, seguido por concentración de la proteína diana. El tampón se intercambió consecutivamente en un volumen de tres a cuatro veces mayor que el del concentrado. Si la conductividad y el pH caían dentro de los criterios, se detenía el proceso. [Criterios - Conductividad: $15,0 \pm 3,0$ mS/cm, pH 6,0 ~ 7,0]. Ajustar el contenido de la solución concentrada a $4,0 \pm 0,5$ mg/mL.
- 40
- 45

I. Nanofiltración.

- Usando un nanofiltro (NFP, Millipore), se llevó a cabo la nanofiltración para eliminar los virus que podían proceder de las células hospedadoras o cualquiera de los materiales utilizados. La prueba de integridad del filtro se realiza después de lavar el nanofiltro con agua para inyección. Una vez que ha pasado la prueba de integridad, el nanofiltro se equilibró con 1 L de tampón de formulación (2,25 g/L de dihidrógeno fosfato sódico monohidrato, 0,99 g/L de hidrógeno fosfato sódico, 8 g/L de cloruro sódico, pH 6,0 ~ 7,0) sin polisorbato 20. Después de la terminación del equilibrado, el concentrado obtenido en H se hizo pasar a través del filtro a una presión de aproximadamente 2 bar para producir un nanofiltrado. Después de haberse completado la filtración, el filtro se lavó con el tampón de
- 50
- 55

formulación (solución de post lavado). Después de combinar la solución de nanofiltración y la solución de post lavado, se determina el contenido de proteína.

J. Sustancia farmacológica.

- 5 La concentración de proteína del filtrado obtenido en I se ajustó con tampón de formulación sin polisorbato 20. Después de la adición de polisorbato, la solución se filtró a través de un filtro de 0,2 μm para producir una sustancia farmacológica. La sustancia farmacológica se dividió en alícuotas y se almacenó en un congelador (-70 ± 10 °C) hasta su uso.

K. Producto farmacológico (llenado, etiquetado, empaquetado).

- 10 El material almacenado en un ultracongelador se descongeló en un baño de agua mantenido a 28 ± 1 °C y se diluyó a una concentración de proteína de alrededor de $2,05 \pm 0,2$ mg/mL usando tampón de formulación (2,25 g/L de dihidrógeno fosfato sódico monohidrato, 0,99 g/L de hidrógeno fosfato sódico heptahidrato, cloruro sódico 8 g/L, 0,23 g/L de polisorbato 20, pH 6,0 ~ 7,0). A continuación, la solución de dilución se filtró a través de un filtro de 0,2 μm para producir una solución a granel final. Esta solución a granel final se introdujo en viales de 6 mL con aproximadamente 3,3 g usando llenado automático. Una vez que se pasó una prueba de inspección de viales, los viales se embalaron para producir un producto farmacológico.

El procedimiento de cultivo de la cepa hasta la producción del producto final se ilustra en la FIG. 3.

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Preparación de Elapraxe

La IDS recombinante comercialmente disponible Elapraxe® se usó como ejemplo comparativo.

- 20 EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: Análisis estructural y caracterización de la IDS de la invención.

<1-1> Secuenciación de aminoácidos - secuenciación interna.

- 25 Se separó IDS desglucosilada mediante SDS-PAGE, seguido por el corte del gel en rodajas. Después, los materiales de digestión resultantes del tratamiento con diversas endoproteinasas (tripsina, quimotripsina, AspN, quimotripsina/tripsina, AspN/tripsina, Gluc y Gluc/tripsina) se analizaron mediante MALDI-MS/MS y LC-ESI-MS/MS (Fig. 5). Como resultado, se identificaron un total de 525 secuencias de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos coincidieron con la secuencia teórica de IDS humana (FIG. 6).

<1-2> Análisis del enlace disulfuro.

- 30 En un polipéptido, un enlace disulfuro es un enlace covalente, normalmente derivado del acoplamiento de dos grupos SH de los restos de cisteína, que desempeña un papel importante en la estabilización de la estructura superior de las proteínas. En teoría, los 525 aminoácidos de la IDS contienen seis restos de cisteína, cuatro de los cuales forman enlaces disulfuro. En este ejemplo, se identificó la situación de los restos de cisteína responsables de los enlaces disulfuro de IDS. En primer lugar, la IDS se desglucosila mediante el tratamiento con PNGasa F para excluir la interferencia de los azúcares. Con el fin de evitar que los restos de cisteína que no intervienen en la formación de enlaces disulfuro actúen como un factor de interferencia, se utilizó 4-vinilpiridina para convertir IDS en una muestra no reducida de forma que los grupos SH están restringidos de la formación aleatoria de enlaces S-S.
- 35 Mientras tanto, los enlaces disulfuro se escindieron mediante DTT, seguido de bloqueo con 4-vinilpiridina para dar una muestra reducida. La tripsina y AspN, seleccionadas en el resultado del Ejemplo Experimental 1 a 3, se aplicaron a la muestra no reducida y a la reducida. Los fragmentos de péptidos obtenidos de este modo se separaron por RP-HPLC. Los cromatogramas RP-HPLC de las muestras no reducidas y reducidas se compararon con el fin de discriminar los picos que se encontraron en la muestra no reducida, pero no en la muestra reducida (FIG. 7).

Para un análisis más exacto, las fracciones de los picos discriminados se redujeron en tamaño por un tratamiento adicional con endoproteinasas, y los picos que contienen enlaces disulfuro se analizaron mediante MALDI-MS (FIG. 8).

- 45 Los picos con enlaces disulfuro fueron de nuevo analizados en cuanto a la secuencia mediante MALDI-MS/MS (FIG. 9) para examinar las posiciones de los restos de cisteína que forman enlaces disulfuro entre los 525 restos de aminoácidos de IDS. Como se muestra en la FIG. 10, se observó que se forman enlaces disulfuro entre C146 - C159 y entre C397 - C407.

<1-3> Análisis del contenido de formilglicina.

- 50 La IDS degrada el sulfato de heparán y el sulfato de dermatán, de los que ambos son un tipo de glicosaminoglicanos (GAG). Esta actividad de degradación no se adquiere hasta que el resto de cisteína en la posición 59 en el sitio activo (Cys59) se convierte en formilglicina (FGly) por modificación post-traducciona. Así pues, la actividad de degradación de IDS se analizó examinando la modificación post-traducciona de Cys59 a FGly. Para este análisis, se

5 utilizó AQUA (cuantificación absoluta), un método de análisis cuantitativo basado en MS (espectroscopía de masas), en el que se fijó un sustrato sintético radiomarcado (péptido AQUA) en una muestra. Para analizar cuantitativamente la formilglicina en la posición Cys59, se añadió en una muestra una dilución en serie de péptidos AQUA y se dibujó una curva de calibración. Las relaciones de péptido tipo FGly a péptido de tipo Cys se midieron por análisis LC-ESI-MS, y se aplican a la curva de calibración AQUA para calcular el contenido de formilglicina.

10 Este análisis determinó la conversión de Cys59 en FGly a razón de $80 \pm 15\%$. Considerando la tasa de conversión de Cys50 en FGly de aproximadamente 50% en el agente disponible comercialmente Elapraxe (Elapraxe Science Discussion, EMEA, 2007; *Genet Med* 2006: 8 (8): 465 - 473), se prevé que la composición terapéutica que comprende la ID de la presente invención y la formulación preparada con la composición tengan una actividad terapéutica mucho mayor en comparación con Elapraxe.

<1-4> Identificación del patrón de glicosilación.

15 Se realizó un ensayo para examinar si la IDS de la presente invención está glicosilada y para identificar el patrón de glicosilación, si es que lo hay. Con este fin, la IDS se trató con diversas enzimas glucósido hidrolasa, los materiales de digestión se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron sus patrones de motilidad.

En detalle, las muestras de IDS se digirieron con combinaciones de las siguientes cuatro enzimas glucósido hidrolasa y se separaron mediante SDS-PAGE.

TABLA 1. Propiedades de las enzimas de escisión de azúcar.

	Función/Propiedad
PNGasa F	- Escinde un resto de azúcar (N-glicano) de la proteína - El Asn en el sitio de escisión se convierte en Asp
Endo H O- glicosidasa	- Escinde un resto de azúcar (N-glicano) de la proteína - a diferencia de la PNGasa F, la Endo H actúa sobre oligosacáridos de tipo alto en manosa y tipo híbrido - Escinde un resto de azúcar (O-glicano) de la proteína
Sialidasa	- Escinde restos de ácido siálico terminal de N-glicano o O-glicano

20 Como puede verse en la FIG. 11, la IDS de la presente invención fue escindida por PNGasa F y Endo H, pero no por O-glucosidasa, lo que indica que la IDS de la presente invención es una proteína N-glicosilada. Además, la IDS fue completamente escindida por PNGasa F, pero su reducción de tamaño era ligera tras el tratamiento con Endo H. La PNGasa F actúa sobre los sitios de glicosilación de los tres patrones mientras que Endo H actúa sobre los sitios de glicosilación de tipo alto en manosa y tipo híbrido. En conjunto, estos resultados indican que la IDS contiene los tres patrones de glicosilación complejo, alto en manosa e híbrido.

<1-5> Análisis del contenido de manosa-6-fosfato.

30 Uniéndose a un receptor de M6P en las células, la manosa-6-fosfato (M6P) permite que la IDS sea internalizada en las células y que así hidrolice el sulfato de heparán o el sulfato de dermatán en los lisosomas. En este Ejemplo, la IDS experimentó hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético (TFA) y se sometió a HPAEC-PAD (Bio-LC) para analizar cuantitativamente la manosa-6-fosfato.

35 La IDS se hidrolizó con TFA 6,75 M y el material hidrolizado se analizó utilizando cromatografía de líquidos (Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alto Rendimiento con Detección Amperométrica Pulsada; HPAEC-PAD). La concentración de M6P de la que ya era conocida, fue analizada bajo mismas condiciones y se obtuvieron relaciones molares de M6P a glicoproteína mediante comparación de las áreas. El análisis se realizó por triplicado. En la FIG. 12 se muestran cromatogramas de materiales estándar M6P y de composición de M6P de la IDS, y las relaciones molares de M6P se resumen en la Tabla 2, a continuación.

TABLA 2. Resultados del análisis del contenido de manosa-6-fosfato.

Exp. nº	M-6-P Tiempo ret. (min)	Cantidad pmol/25 µm M-6-P	Cantidad pmol/25 µm proteína	Relación m-6-P/proteína (mol/mol)
13	11,25	1320,59	428	3,09
14	11,23	1241,31	428	2,90
15	11,23	1245,83	428	2,91
media	11,24	1269,25	428	2,97
CV	0,09%	3,51		0,11

5 Como se entiende por los datos de la Tabla 2, hay aproximadamente 3 moles de M6P por mol de IDS. A partir de estos resultados, se infiere que la composición terapéutica que comprende la IDS de la presente invención y la formulación preparada con la composición, tienen una alta capacidad para catabolizar GAG acumulado en los lisosomas.

<1-6> Análisis de masas.

10 Las masas de IDS glicosilada e IDS desglicosilada se midieron utilizando MALDI-TOF-MS. El tratamiento de IDS glicosilada con PNGasa F proporcionó IDS desglicosilada. MALDI-TOF-MS se realizó con Voyager-DE PRO Biospectrometry (Applied Biosystems, EE.UU.) acoplado con un espectrómetro de masas de desorción por láser de extracción retardada. El instrumento se normalizó con albúmina de suero bovino e IgG1. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 3, a continuación.

TABLA 3. Resultados de análisis MALDI-TOF-MS de IDS.

IDS glicosilada			
m/z	carga (z)	Masa de proteína (Da)	Observaciones
25646	3	76935	
38708	2	77414	
77360	1	77359	
154533	1	77266	dímero
media		77244 ± 210	
IDS desglicosilada			
m/z	carga (z)	Masa de proteína (Da)	Observaciones
29767	2	59532	
34655			PNGasa F
59313	1	59312	
118706	1	59353	dímero
Media		59399 ± 120	
Muestra		Peso molecular	
Teórica		59298 Da	
Glicosilada		77244 ± 210 Da	
Desglicosilada		59359 ± 120 Da	

Como es evidente a partir de los datos de la Tabla 3, el tamaño molecular es 77.244 Da para la IDS glicosilada y 59.399 Da para la IDS desglucosilada, similar al peso molecular calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos, que es 59.298 Da.

5 <1-7> Medida de la pureza.

La pureza de la IDS se midió utilizando cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía de exclusión por tamaño es un método cromatográfico en el que las moléculas en solución se separan por su peso molecular relativo y su forma. En la cromatografía de exclusión por tamaño, las proteínas más grandes que el tamaño de poro de la columna no pueden penetrar en el sistema de poros y pasan inmediatamente a través de la columna. Posteriormente, los analitos con pesos o tamaños moleculares más pequeños eluyen más tarde. Para esta cromatografía se empleó el sistema Alliance 2695 HPLC (Waters, WI, EE.UU.), junto con el detector 2487 UV/VIS (Waters, WI, EE.UU.). Las proteínas se detectaron a 214 nm, y se analizaron usando Empower 2 Software. Los analitos se cargaron en una columna TSK G3000SWXL unida a una columna de guarda TSK SWXL (Tosoh, Japón). La IDS, después de ser diluida a una concentración de 1,0 mg/mL en un tampón de formulación, se cargó en un volumen de 10 µm en la columna. Se dejó fluir con fase móvil (tampón de fosfato sódico 20 mM, NaCl 200 mM, pH 7,0) a un caudal de 0,5 mL/min durante 60 min.

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 13. Como puede observarse, los monómeros de IDS tenían un tiempo de retención de aproximadamente 16,4 min, y se eluyeron con 100% de pureza.

<1-8> Medida de la actividad usando sustrato sintético.

20 La reacción de IDS con el sustrato sintético (4-metilumbeliferil-L- iduronida-2-sulfato sódico (MU-IdoA-2S) durante 4 horas libera el resto sulfato (reacción primaria). Después de la reacción primaria, la adición de LEBT (enzimas lisosomales purificadas de testículos bovinos) induce una reacción enzimática secundaria con el sustrato 4-metilumbeliferil- L-iduronida (reactivo que queda después de la liberación de la fracción de sulfato en la reacción primaria) para separar el resto 4-metilumbeliferilo del resto L-iduronida. Dado que el 4-metilumbeliferilo restante es fluorogénico, la actividad de IDS se evaluó midiendo la intensidad de fluorescencia (Ex.355 nm/Em.460nm). Se encontró que la IDS de la presente invención está en el intervalo de actividad específica de 19 a 55 nmol/min/µg. Esta actividad indica que la formilglicina existe en el sitio activo de la enzima como consecuencia de la modificación post-traducciona del resto cisteína en la posición 59 en la IDS.

<1-9> Medida de la actividad usando sustrato natural.

30 Para determinar la reacción con la IDS y el sustrato natural, se midieron los iones sulfato liberados del sustrato (disacárido de heparina) por reacción con IDS. La mezcla de reacción se cargó en una columna iónica (Vydac 3021C) y se dejó fluir con la fase móvil de 0,49 g/L de ácido ftálico a una velocidad de flujo de 2 ml/min, durante lo cual se detectaron iones sulfato libres a 290 nm en modo negativo.

35 Como se muestra en la FIG. 14, se confirmó que la IDS hidroliza ion sulfato de disacárido heparina, lo que indica que la IDS es capaz de degradar sulfato O-ligado de sulfato de dermatán y sulfato de heparán in vivo.

<1-10> Actividad de absorción celular in vivo.

40 La actividad de la internalización celular de la IDS se midió usando las células de fibroblasto normales y células de pacientes con síndrome de Hunter. En este sentido, las células de fibroblastos normales y células de paciente con síndrome de Hunter (obtenidas de Samsung Medical Center, Seúl, Corea) se cultivaron y se dejaron internalizar en las células mientras se incubaron con varias concentraciones de IDS a 37 °C durante 20 horas en una incubadora con 5% de CO₂. Después de ser recolectadas, las células se lisaron y se determinó en el lisado el nivel de IDS internalizada en las células.

45 Basándose en la relación de concentración de IDS internalizada a IDS añadida a las células de fibroblastos normales, se construyó un gráfico de Michaelis-Menten y una representación de Lineweaver-Burk a partir de la cual se calculó la K_{uptake} (absorción; concentración de IDS en la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima alcanzada a concentraciones saturantes de sustrato). Se calculó que la K_{uptake} era 18,0 nM o menos, lo que indica que IDS se internaliza en las células mediante la unión del M6P de IDS a receptores de M6P en la superficie celular (FIG. 15).

50 También, se analizaron la absorción (*uptake*) celular y la actividad de IDS en las células de pacientes con síndrome de Hunter, así como células de fibroblastos humanos normales. La absorción y la actividad de la IDS se incrementaron en ambas células, lo que demuestra que la IDS de la presente invención es internalizada más eficientemente en las células (Fig. 16).

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Análisis clínico para efecto de IDS.

Treinta y un pacientes con síndrome de Hunter se dividieron en tres grupos, se les administró la IDS de la presente invención y se analizaron en cuanto a los parámetros asociados con el síndrome de Hunter. Se utilizó como control positivo Elaprase®, un agente terapéutico disponible en el mercado para el síndrome de Hunter.

5 <2-1> Cambio en el nivel de GAG en orina (parámetro de comprobación primaria para la prueba de validez).

Los tres grupos de pacientes con síndrome de Hunter se trataron durante 24 semanas con Elaprase (0,5 mg/kg) y se midieron los niveles de IDS de la presente invención (0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg), y GAG (glucosaminoglucanos) en orina, como se informó anteriormente (Conn. Tissue Res. Vol. 28, pp317 - 324, 1990; Ann. Clin. Biochem. vol.31, pp147 - 152, 1994). Las medidas se resumen en la Tabla 4, a continuación.

10 TABLA 4: Cambio en el nivel de GAG en orina con la administración de IDS.

Grupo	Elaprase (0,5 mg/kg)	IDS de la invención (0,5 mg/kg)	IDS de la invención (1,0 mg/kg)
Cambio en el nivel de GAG en orina (%)	- 18,7	- 29,5	- 41,1

15 En pacientes con síndrome de Hunter, como se muestra en la Tabla 4, los niveles de GAG de orina disminuyeron en un 18,7% tras la inyección de Elaprase, pero en un 29,5% tras la inyección de IDS de la presente invención en la misma dosis. Además, cuando se inyecta a una dosis de 1,0 mg/kg, la IDS de la presente invención reduce el nivel de GAG en orina en hasta un 41,1%. Estos resultados demuestran que la IDS de la presente invención es eficazmente terapéutica para el síndrome de Hunter, una enfermedad causada como resultado de la acumulación de GAG.

<2-2> Cambio de 6-MWT (6 Minute Walking Test: prueba de la marcha de seis minutos) (parámetro secundario de comprobación para la prueba de validez).

20 Después de que a los pacientes con síndrome de Hunter se les administró Elaprase y la ID de la presente invención durante 24 semanas, se midieron las distancias que recorrieron durante 6 minutos de acuerdo con el método descrito en AM. J. Respir. Crit. Care. Med., Vol 166, pp 111 - 117, 2002. Los resultados se dan en la Tabla 5, a continuación.

TABLA 5: Resultados de la prueba 6-MWT.

Grupo	Elaprase (0,5 mg/kg)	IDS de la invención (0,5 mg/kg)	IDS de la invención (1,0 mg/kg)
Distancia de 6-MWT (m)	5,9	67,6	52,8
Cambio en 6-MWT (%)	1,3	18,2	13,4

25 Como se muestra en la Tabla 5, el cambio de 6-WMT fue solamente 1,3% para los pacientes tratados con Elaprase, pero aumentó a 18,2% para los pacientes tratados con la misma dosis de IDS de la presente invención. Los pacientes con síndrome de Hunter tienen problemas para caminar debido a la contractura. Sin embargo, la IDS de la presente invención mejora los síntomas y por tanto es eficaz para el tratamiento del síndrome de Hunter.

30

Lista de secuencias.

- SEQ ID N°: 1 secuencia de aminoácidos de IDS
- 5 SEQ ID N°: 2 secuencia del cebador directo IDS-1
- SEQ ID N°: 3 secuencia del cebador directo IDS-2
- SEQ ID N°: 4 secuencia del cebador inverso IDS-3
- SEQ ID N°: 5 secuencia del cebador directo IDS-N1
- SEQ ID N°: 6 secuencia del cebador directo IDS-N2
- 10 SEQ ID N°: 7 secuencia del cebador inverso IDS-4
- SEQ ID N°: 8 secuencia del cebador directo T7

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de iduronato-2-sulfatasa (IDS) que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 1, en donde un resto de cisteína en posición 59 en la secuencia de aminoácidos de la IDS se convierte en formilglicina (FGly) a una relación molar del 65% o mayor, preferiblemente a una relación molar de 75% o mayor.
2. La composición de IDS según la reivindicación 1, en donde la IDS que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°: 1 contiene manosa-6-fosfato en una cantidad de 2,0 a 4,0 moles por mol de IDS, preferiblemente en una cantidad de 2,5 a 3 moles por mol de IDS.
3. Una formulación que comprende la composición de IDS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
- 10 4. La formulación según la reivindicación 4, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente una o más sustancias elegidas entre el grupo consistente en un tampón, un hidrato de carbono, un agente estabilizante, un antioxidante, un agente bacteriostático, un agente quelante, un coadyuvante, un agente de suspensión, un espesante y un conservante.
- 15 5. Un método para preparar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende:
- (1) cultivar una cepa de células recombinantes transformadas con un gen que codifica IDS representada por SEQ ID NO: 1 y obtener el cultivo; y
- (2) purificar el cultivo mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad, en donde la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo usando un tampón de elución con un pH de 4,0 a 6,0.
- 20 6. El método según la reivindicación 5, que comprende
- (1) transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que lleva un gen de IDS para obtener una cepa de células recombinantes;
- (2) cultivar la cepa de células recombinantes en presencia de un hidrolizado en un medio libre de suero y obtener el cultivo;
- (3) purificar la IDS procedente del cultivo por medio de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad; y
- (4) combinar la IDS purificada con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde la célula hospedadora es una célula de ovario de hamster chino.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la cromatografía hidrofóbica se lleva a cabo usando un tampón de elución con un pH de 5,0 a 7,0.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la cromatografía de afinidad se lleva a cabo usando un tampón de elución con un pH de 6,0 a 8,0.
- 35 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo usando un tampón de elución con un pH de 5,5 a 7,5.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, que comprende además inactivar virus a un pH de 3,0 a 4,0.
12. Una composición preparada por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
- 40 13. Un método para preparar una formulación, que comprende formular la composición según las reivindicaciones 1 ó 2 con un vehículo aceptable farmacéuticamente, y opcionalmente con una o más sustancias elegidas entre el grupo consistente en un tampón, un hidrato de carbono, un estabilizante, un antioxidante, un agente bacteriostático, un agente quelante, un coadyuvante, un agente de suspensión, un espesante y un conservante.
- 45 14. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 12, o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, para su uso en el tratamiento del síndrome de Hunter.

[Fig. 1]

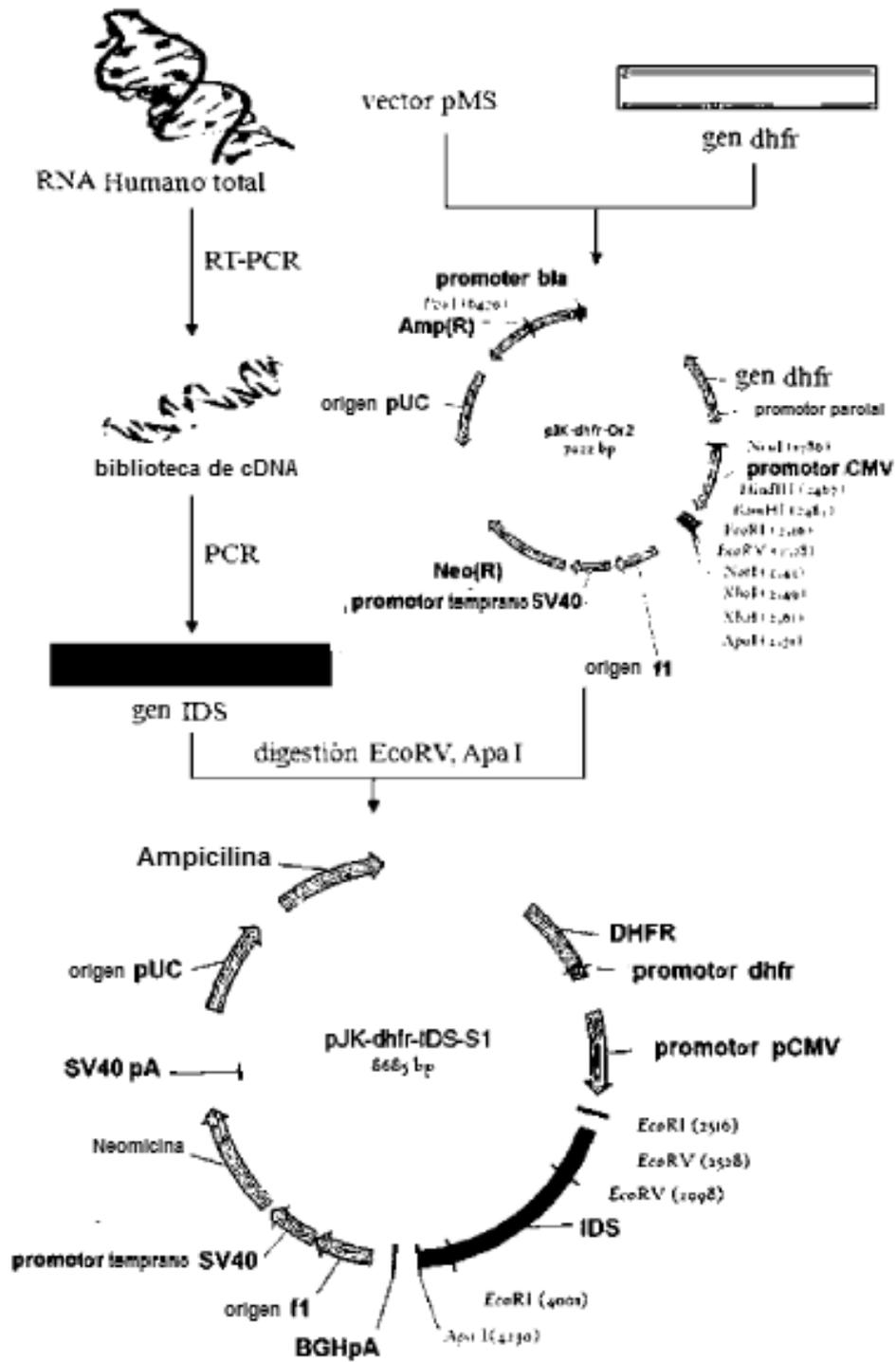
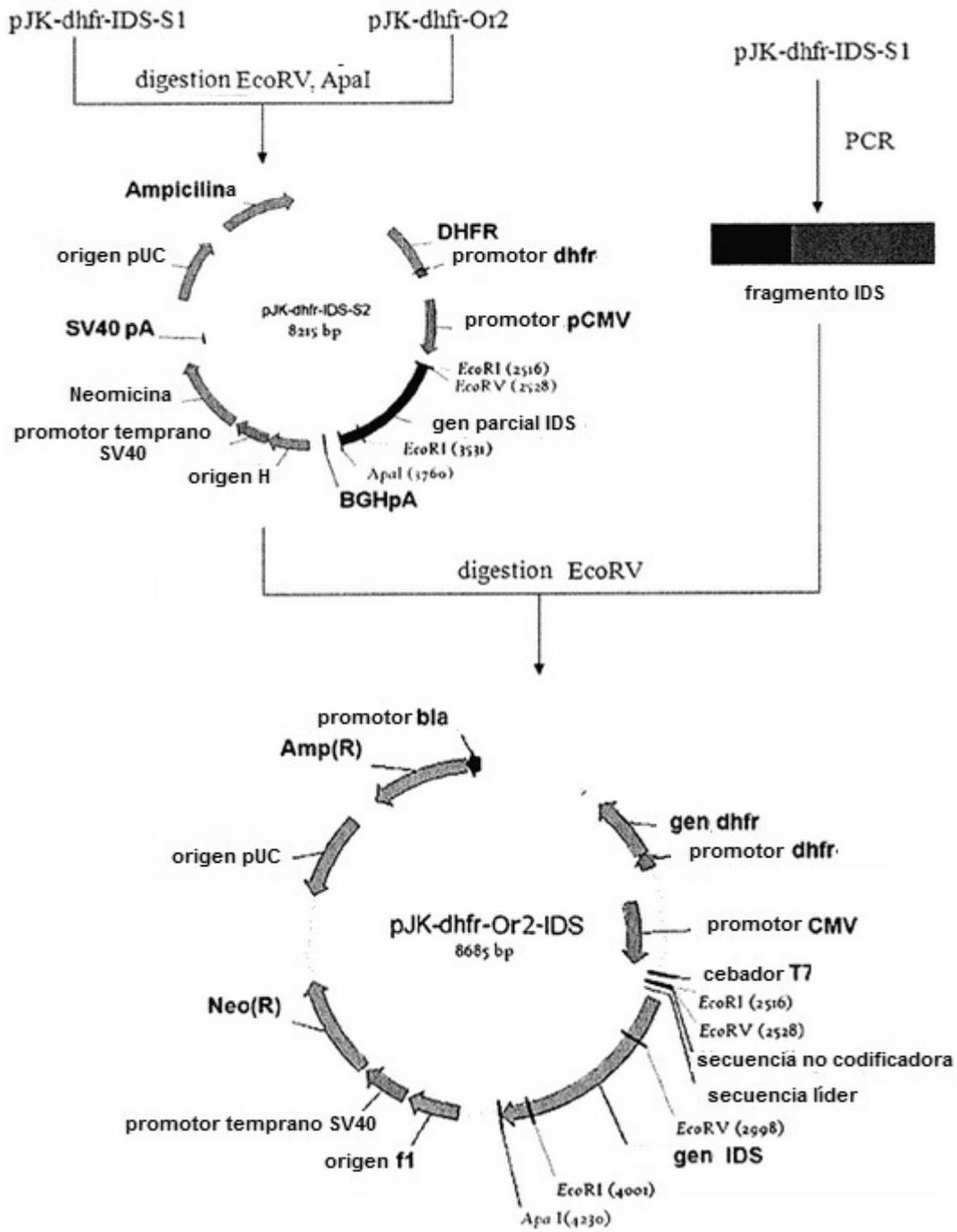
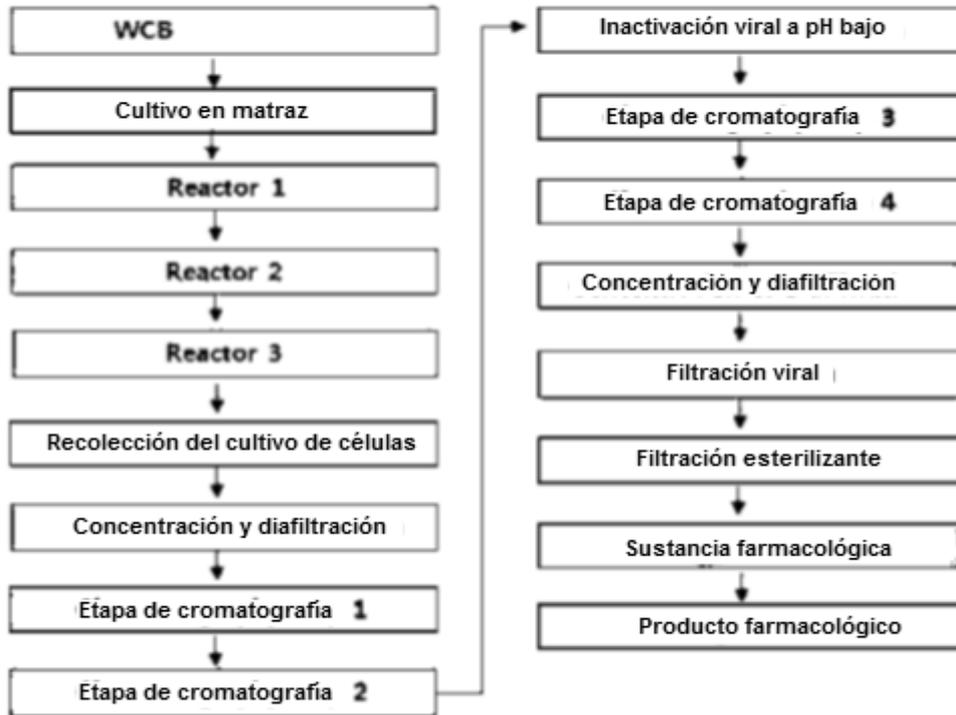


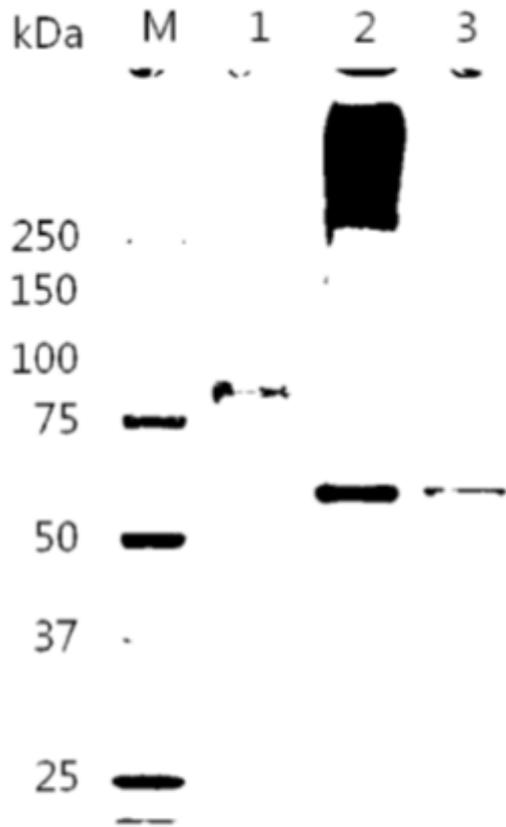
FIG. 2



[Fig. 3]



[Fig. 4]



Calle M: Marcador tamaño de proteína

Calle 1: IDS glicosilada

Calle 2: IDS tratada con PNGasa F

Calle 3: IDS desglicosilada

[Fig. 5]

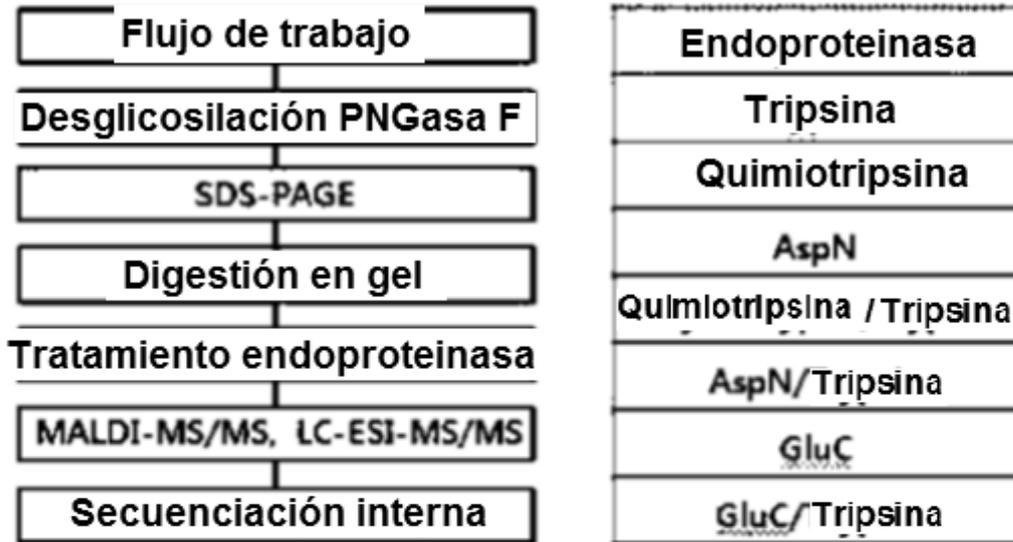
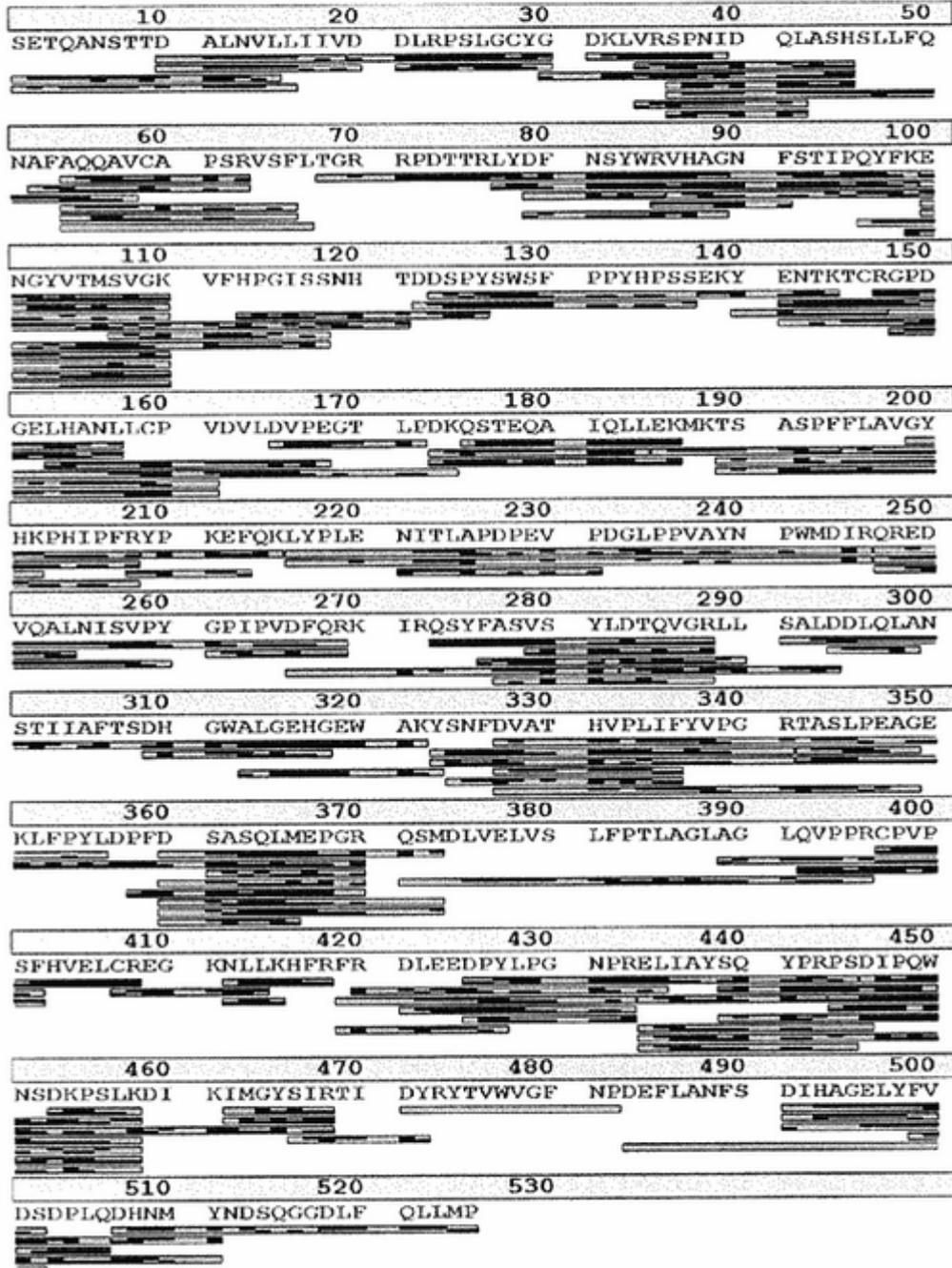
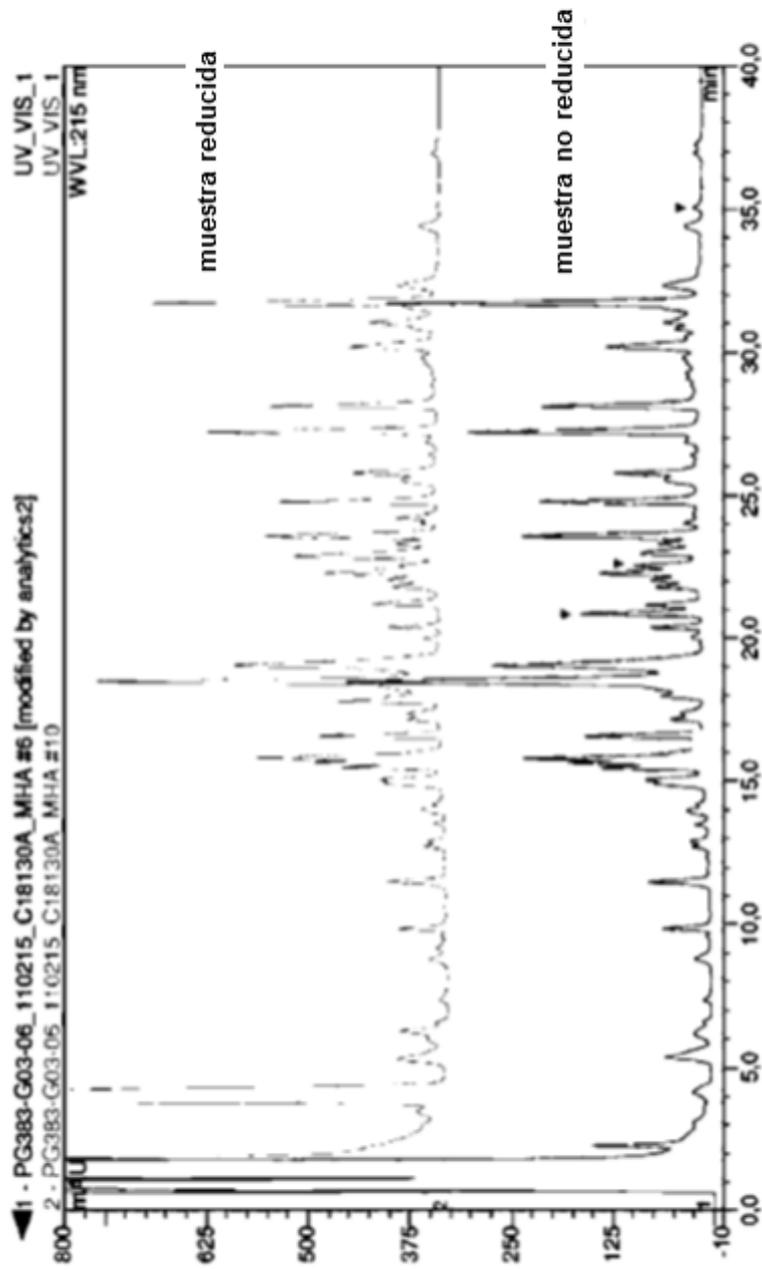
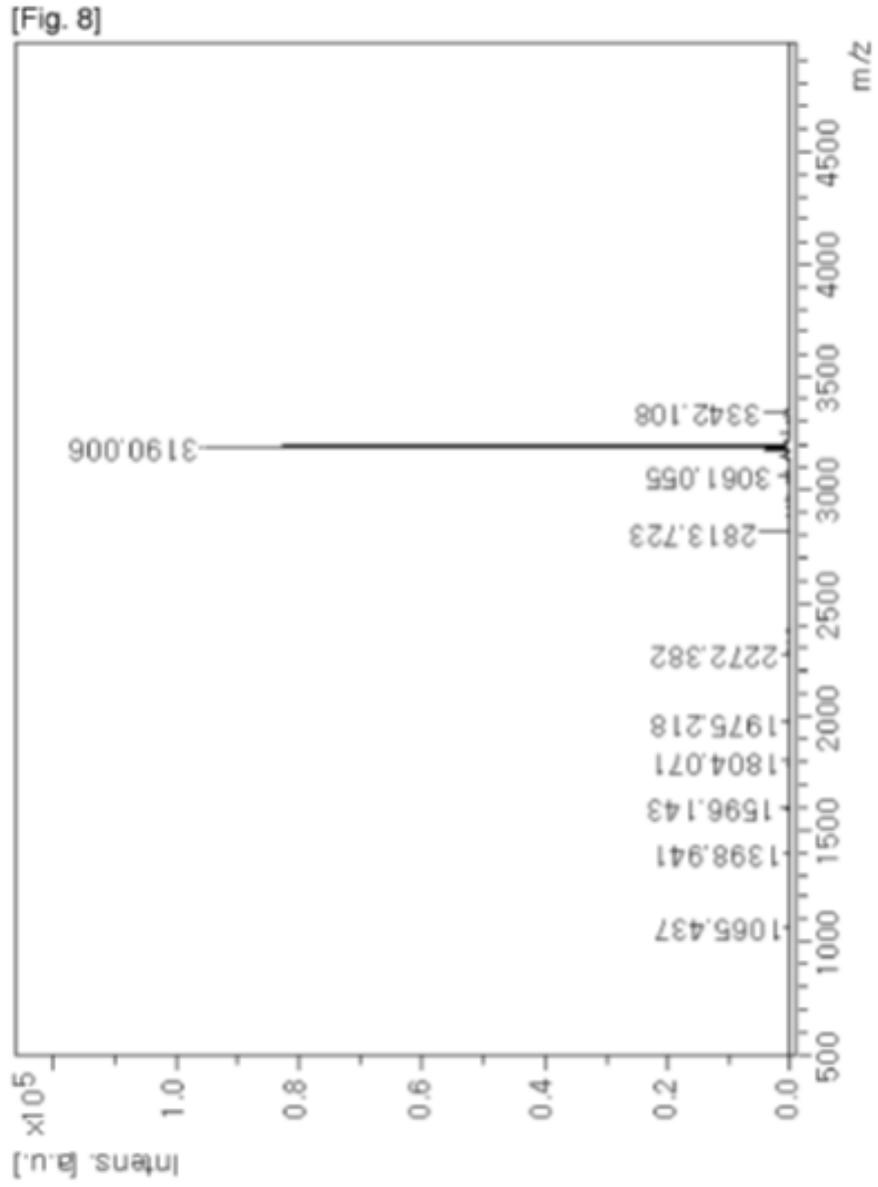


FIG. 6

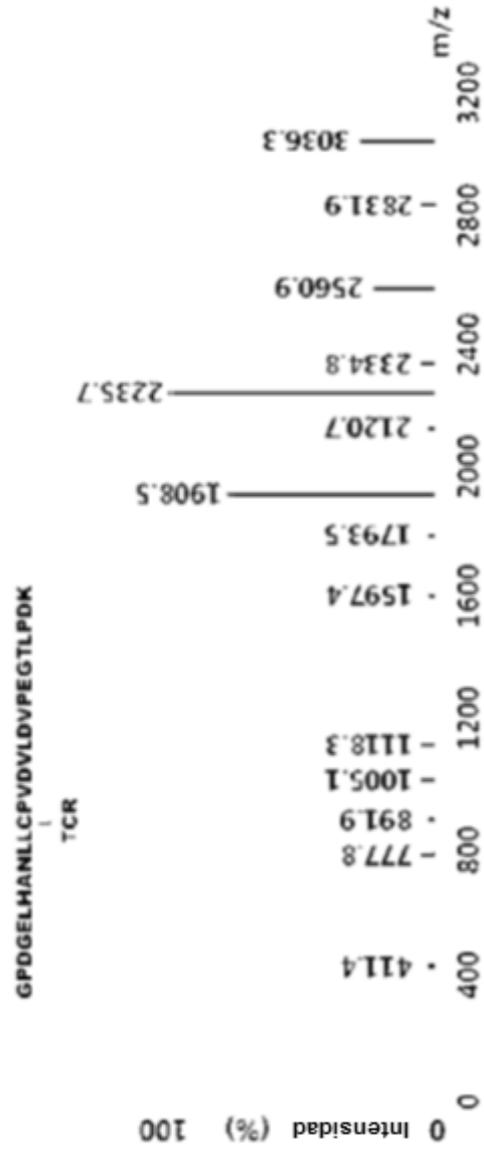


[Fig. 7]

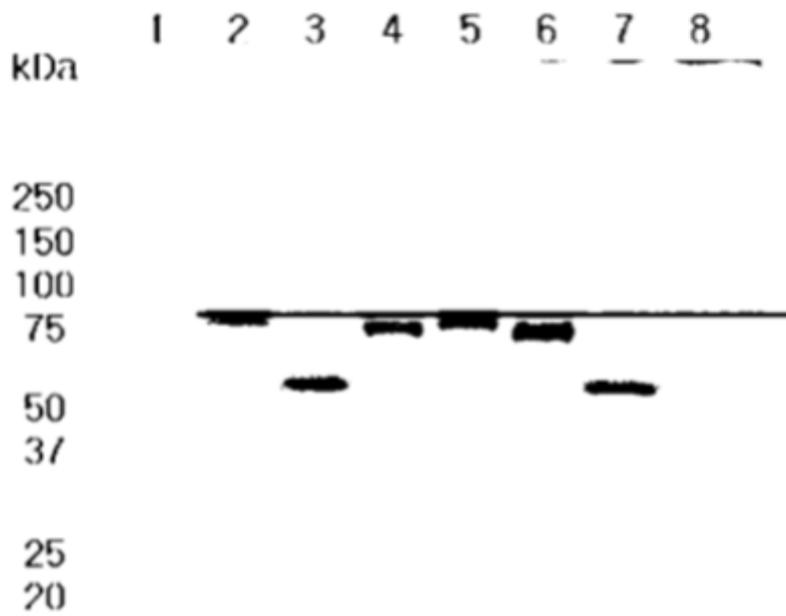




[Fig. 9]



[Fig. 11]



Calle 1, 8: Marcador de tamaño molecular

Calle 2: IDS

Calle 3: IDS tratada con PNGasa F

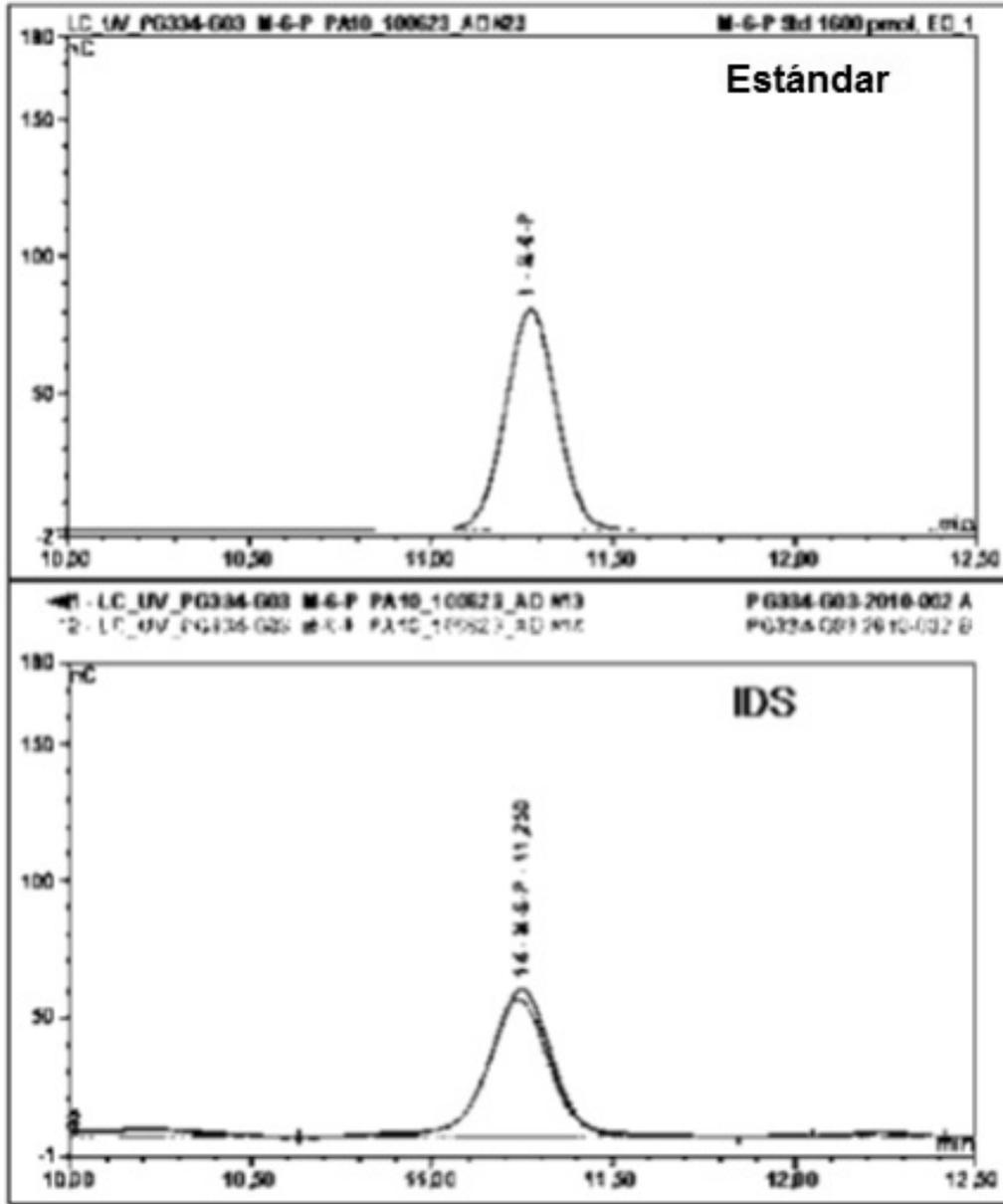
Calle 4: IDS tratada con I ndo II

Calle 5: IDS tratada con O-glicosidasa

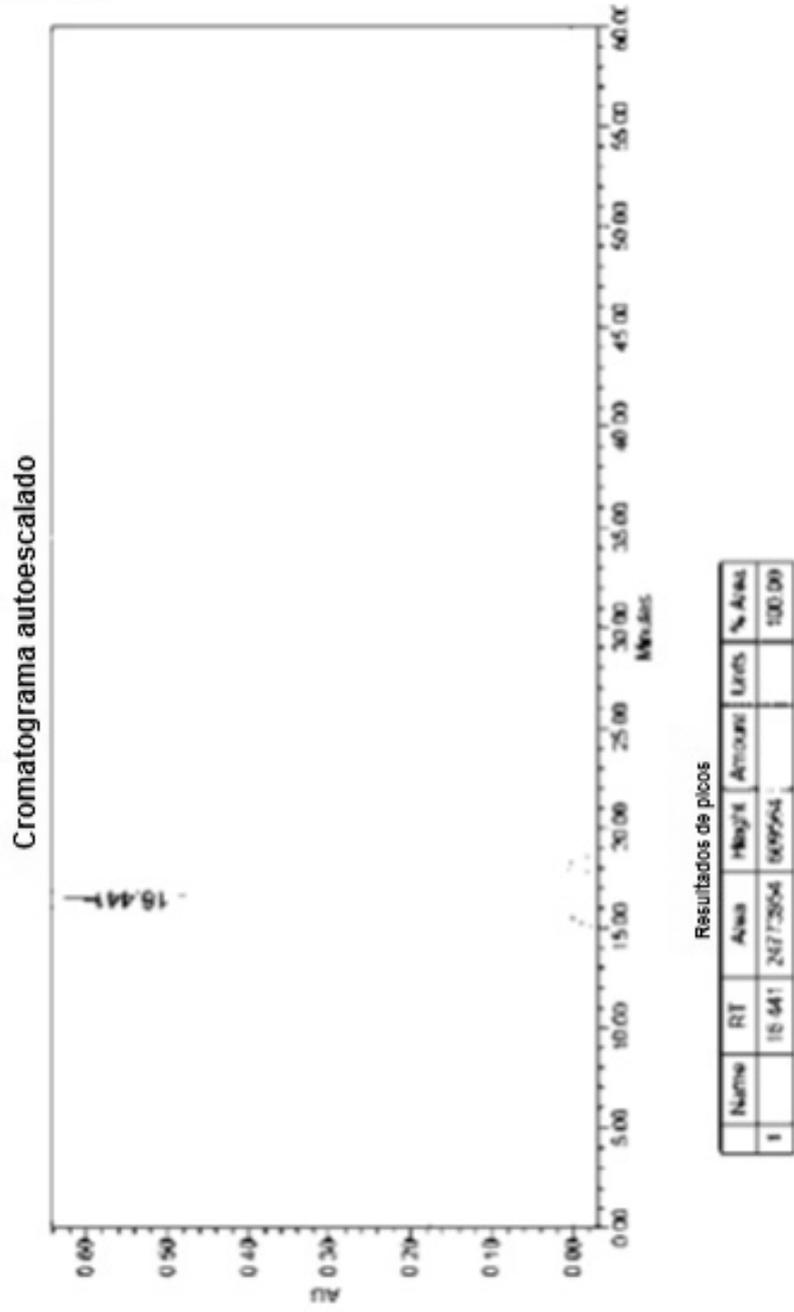
Calle 6: IDS tratada con Sialidasa

Calle 7: IDS tratada con PNGasa y O-glicosidasa

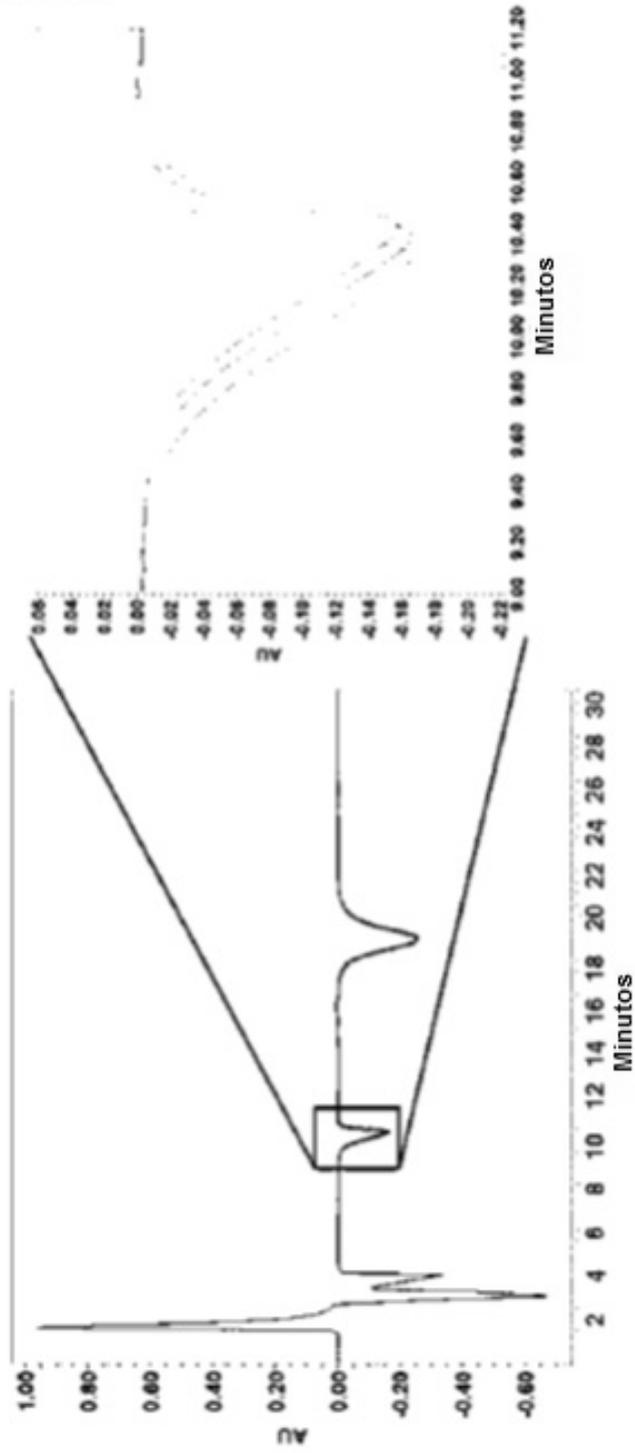
[Fig. 12]



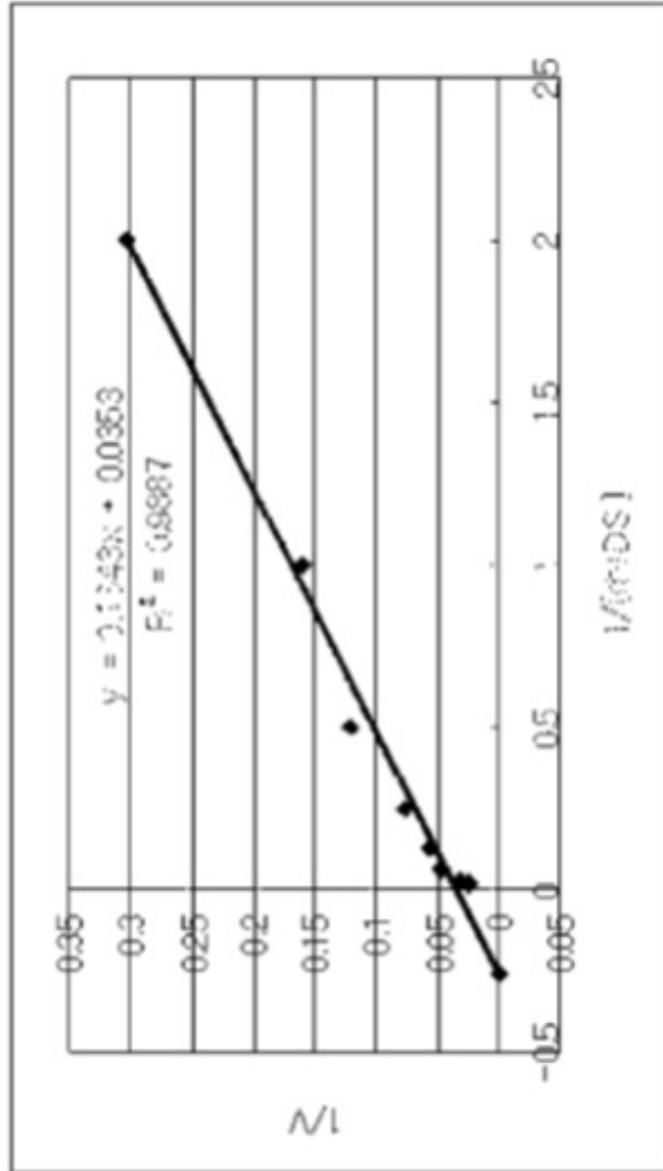
[Fig. 13]



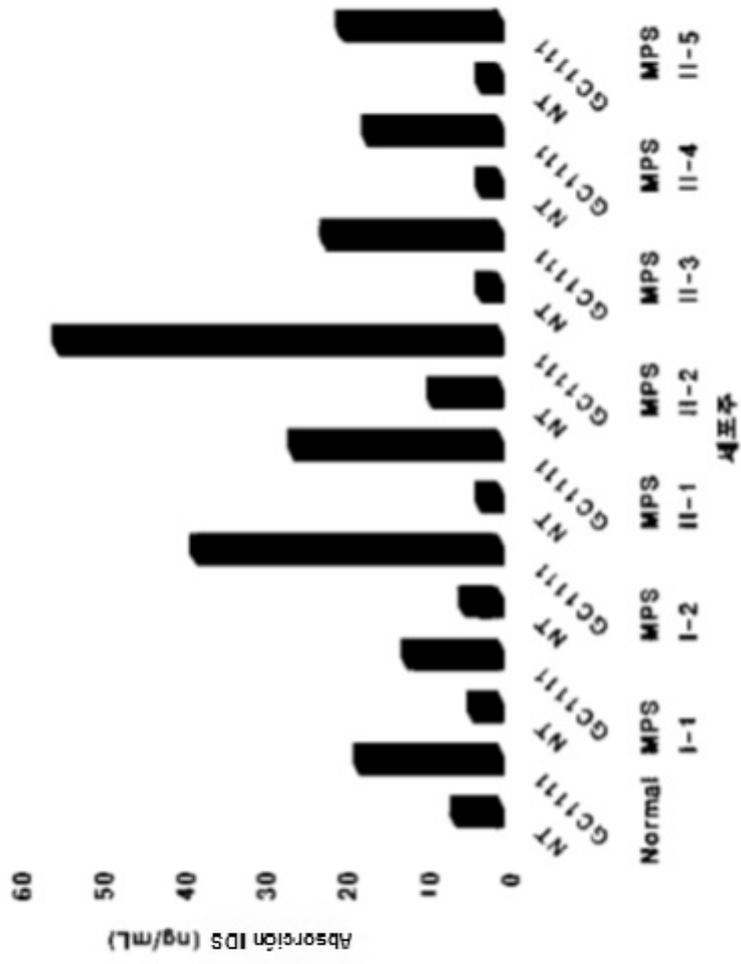
[Fig. 14]



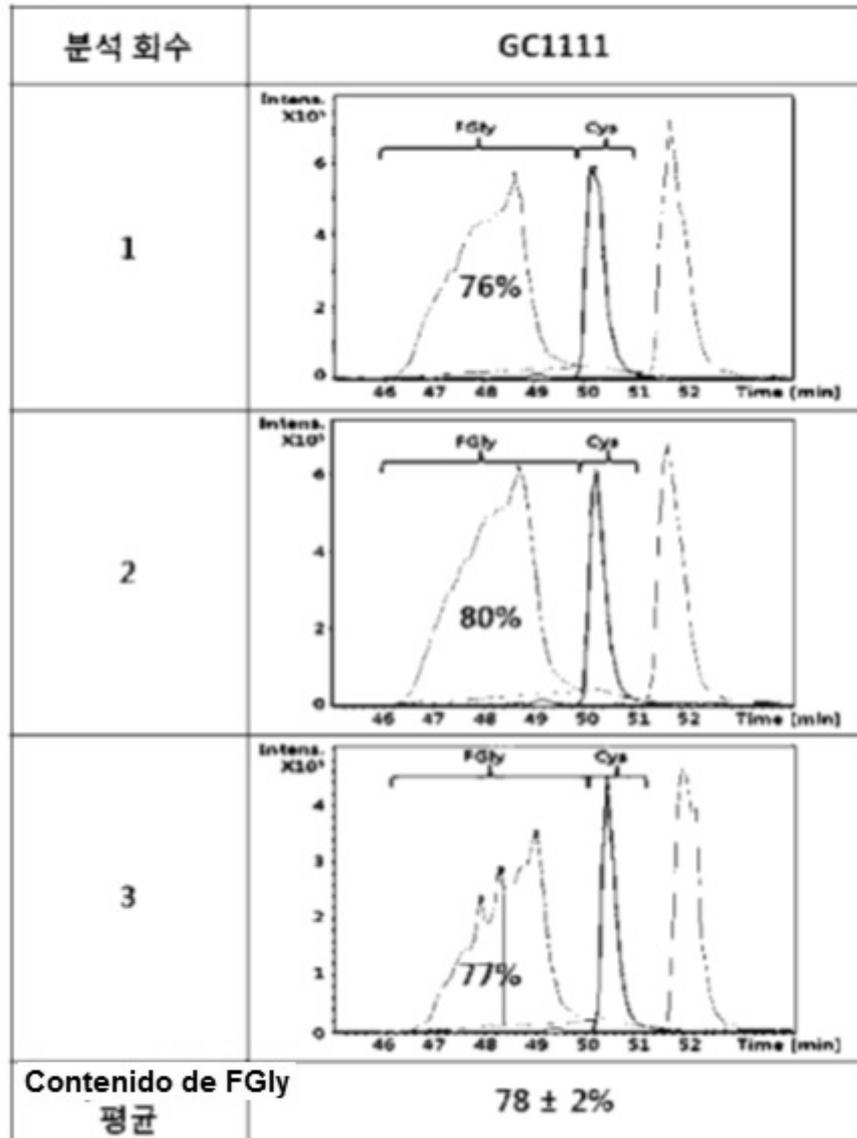
[Fig. 15]



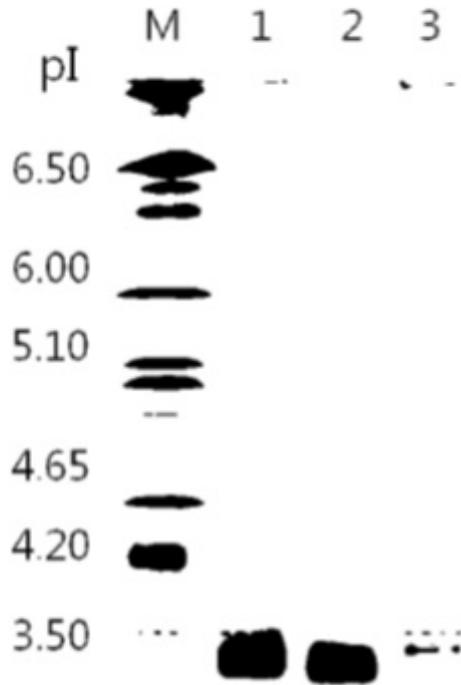
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



Calle M: marcador de tamaños

Calle 1: una muestra cargada para cromatografía de intercambio catiónico

Calle 2: un eluato de cromatografía de intercambio catiónico

Calle 3: una solución de regeneración después de cromatografía de intercambio catiónico