

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 584**

51 Int. Cl.:

C12N 9/96 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010** E 10781143 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** EP 2435459

54 Título: **Utilización de chaperonas farmacológicas para mejorar la fabricación y la purificación de β -glucosidasa ácida**

30 Prioridad:

26.05.2009 US 181255 P

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

06.10.2016

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
6 Cedar Brook Drive
Cranbury, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

DO, HUNG, V.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 585 584 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

Utilización de chaperonas farmacológicas para mejorar la fabricación y la purificación de β -glucosidasa ácida

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 61/181.255, presentada el 26 de mayo de 2009.

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención proporciona métodos para mejorar la producción de proteínas recombinantes a través del uso de chaperonas farmacológicas para las proteínas recombinantes. La unión de una chaperona farmacológica a una proteína recombinante expresada por una célula puede estabilizar la proteína e incrementar la exportación de la proteína fuera del retículo endoplásmico de la célula, e incrementar la secreción de la proteína por la célula.

10 **2. Antecedentes**

Diversas proteínas humanas recombinantes se producen usando sistemas de cultivo de células de mamífero que sobreexpresan y secretan estos productos biológicos en el medio, que a continuación se purifican mediante procedimientos cromatográficos. Proteínas recombinantes producidas satisfactoriamente incluyen proteínas secretoras (p. ej., factores de coagulación sanguínea, inmunoglobulinas, eritropoyetina y otras hormonas, inhibidores de elastasa, etc.) y enzimas lisosómicas (p. ej., β -glucocerebrosidasa, α -galactosidasa A, α -glucosidasa ácida, etc.). Varios factores críticos afectan a la eficacia y el rendimiento en tal procedimiento de fabricación: el nivel de expresión para la línea celular; si la proteína recombinante secretada mantiene su actividad biológica en el medio de cultivo celular antes de la purificación; y el esquema de purificación de la proteína para la recuperación del producto biológico.

Los ejemplos anteriores son proteínas que comparten todas una ruta biosintética común en el retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés) (Blobel y cols., 1979). Estas proteínas (que incluyen todas las proteínas membranarias, proteínas secretoras, proteínas peroxisómicas y lisosómicas) también comparten una ruta de exportación común del ER que conduce las proteínas recientemente sintetizadas al aparato de Golgi para modificaciones postraduccionales adicionales para clasificar diferentes clases de proteínas de modo que alcancen sus destinos celulares y extracelulares pretendidos (Kornfeld, 1987). Para que estas proteínas alcancen sus destinos finales, en primer lugar se deben plegar como estructuras estables que pasen suficientemente el sistema de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) del ER antes de salir de este compartimento (Ellgaard & Helenius, 2003). Las proteínas mutantes a menudo no se pliegan establemente y son reconocidas y retenidas por el sistema QC del ER (Ellgaard & Helenius, 2003). Si estas proteínas mutantes no alcanzan una conformación estable después de múltiples intentos, finalmente son eliminadas por los sistemas de degradación asociada al ER (ERAD, por sus siglas en inglés). Se ha observado que una retención aberrante en el ER de proteínas mutantes menos estables y una ERAD excesiva son la principal causa de numerosas enfermedades incluyendo fibrosis quística, diabetes tipo 2 y diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico (Schmitz y cols., 2005; Fan y cols., 1999; Tropak y cols., 2004).

También se observa la degradación prematura de proteínas normales de modo que una fracción apreciable de proteínas silvestres no alcance conformaciones estables dentro del espacio de tiempo asignado y finalmente sea eliminada por ERAD. El ejemplo más citado es la eliminación de 50-70% del canal de iones cloruro regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés) silvestre. Se cree que las proteínas complejas grandes (p. ej., CFTR, receptores, factores de coagulación, etc.) tienden a plegarse menos eficazmente que los homólogos más simples y más pequeños y por lo tanto son propensas a una degradación prematura. Por otra parte, Randall Kaufman y colaboradores describieron la acumulación de Factor VIII humano recombinante y el hinchamiento inusual del ER, la activación aguda de ciertas cinasas y diversas rutas celulares durante la producción de este producto biológico. Estos efectos celulares profundos se conocen ahora como estrés del ER asociado con la expresión de proteínas complejas y otras proteínas problemáticas (p. ej., Factor VIII y antitripsina α -1 en forma Z). También se cree que la acumulación de proteína, la degradación excesiva y el estrés del ER afectan adversamente a la producción de proteínas recombinantes y conducen a bajos rendimientos de proteínas. Así, existe una necesidad de mejorar los procedimientos de fabricación de proteínas recombinantes.

El documento WO2004074450 se refiere a un método para mejorar la eficacia de la terapia génica para deficiencias de proteínas mediante la administración de una chaperona, p. ej. isofagomina, potenciando de ese modo la expresión, la eficacia y la estabilidad in vivo de β -glucosidasa ácida.

El documento WO2008054947 divulga métodos para identificar una chaperona para β -glucosidasa ácida, p. ej. isofagomina, y describe la expresión de una β -glucosidasa ácida mutada en fibroblastos de un paciente con enfermedad de Gaucher en presencia o ausencia de isofagomina.

El documento WO2004069190 divulga un método para incrementar la producción de una proteína recombinante, p. ej. β -glucosidasa ácida, en células hospedadoras no mamíferas al poner en contacto la célula hospedadora en un medio que comprende una chaperona, p. ej. isofagomina.

3. Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un método para mejorar la producción de β -glucosidasa ácida recombinante a través del uso de la chaperona farmacológica isofagomina (también conocida como chaperonas sitioespecíficas activas; ASSC, por sus siglas en inglés). La producción de una proteína recombinante (p. ej., α -glucosidasa ácida, α -galactosidasa A ácida o β -glucosidasa ácida) se puede mejorar, por ejemplo, mediante la unión de una chaperona farmacológica (p. ej., 1-desoxinorjirimicina, 1-desoxigalactonorjirimicina o isofagomina) a una β -glucosidasa ácida
10 recombinante expresada en una célula hospedadora.

En una realización no limitativa, la β -glucosidasa ácida recombinante es expresada por una línea celular in vitro. En otra realización no limitativa, la célula hospedadora es una célula de mamífero. En otra realización no limitativa, la célula hospedadora puede ser una célula CHO, una célula HeLa, una célula HEK-293, una célula 293T, una célula COS, una célula COS-7, un mioblasto primario de ratón o una célula NIH 3T3.

15 En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante incrementa la exportación de la proteína fuera del retículo endoplásmico de la célula.

En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante incrementa la secreción de la proteína desde la célula.

20 En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante estabiliza la proteína fuera de la célula después de la secreción de la proteína por la célula.

En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante reduce el estrés del retículo endoplásmico asociado con la expresión de la proteína recombinante.

En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante incrementa la estabilidad de la proteína a un pH mayor de 5,0.

25 En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante estabiliza la proteína recombinante durante la purificación de la proteína desde el medio de cultivo celular después de la secreción por la célula. En una realización no limitativa adicional, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante durante la purificación de la proteína desde el medio de cultivo celular después de la secreción por la célula incrementa el rendimiento de la proteína purificada.

30 En otra realización no limitativa, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante puede estabilizar la proteína durante el almacenamiento. En una realización no limitativa adicional, la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la β -glucosidasa ácida recombinante reduce la digestión proteolítica y/o el daño químico a la proteína durante el almacenamiento.

4. Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 representa la estabilidad de GAA humana recombinante (Myozyme[®], Genzyme Corp.) a pH neutro (7,4) o pH ácido (5,2) en presencia o ausencia de 100 μ M de hidrocloreto de 1-desoxinorjirimicina (1-DNJ-HCl) según se determina en un ensayo de estabilidad térmica. El ensayo de estabilidad térmica utiliza calor para inducir la desnaturalización de proteínas, que se verifica usando un colorante SYPRO Orange que emite fluorescencia al unirse a aminoácidos hidrófobos (que no están expuestos en una proteína plegada). Una estructura proteínica que requiera más calor para desnaturalizarse es por definición más estable. Myozyme es normalmente mucho más estable a pH lisosómico (5,2) que a pH neutro (7,4). Sin embargo, la estabilidad de la enzima a pH 7,4 se incrementa significativamente al añadir 100 μ M de desoxinorjirimicina, en comparación con Myozyme sola.

45 La Figura 2A representa los efectos de 1-DNJ-HCl sobre la actividad de GAA humana recombinante (rhGAA; Myozyme[®], Genzyme Corp.) a pH neutro (7,4) o pH lisosómico (5,2) a 37°C. La actividad de GAA se evaluó para determinar la capacidad de una ASSC para prolongar la actividad de rhGAA a lo largo del tiempo. Se incubó Myozyme (45 nM) en tampón de pH 7,4 o pH 5,2 con o sin 1-DNJ 50 μ M a 37°C a lo largo de 24 horas. Se ensayó la actividad de la enzima GAA de las muestras usando 4-MU- α -glucosa a las 0, 3, 6 y 24 horas y la actividad residual de GAA se expresó como % de la actividad inicial. Estos resultados indican que la 1-DNJ mejora la pérdida de actividad de la enzima GAA a pH neutro (7,4).

50 La Figura 2B representa un experimento de estabilidad térmica de SYPRO Orange en paralelo para determinar si la pérdida de actividad enzimática mostrada en la Figura 2A, particularmente la pérdida de actividad de Myozyme a pH neutro (7,4), se correlaciona con el despliegue y la desnaturalización de la proteína. Se incubó Myozyme (0,9 μ M) en

tampón de pH 7,4 o pH 5,2 con o sin 1-DNJ-HCl 10 μ M a 37°C y el plegamiento de la proteína se verificó cada hora a lo largo de 24 horas. Las Figuras 2A y 2B muestran que la desnaturalización de GAA se correlaciona con la pérdida de actividad enzimática. De forma más importante, estos resultados indican que la 1-DNJ puede prevenir la desnaturalización de GAA y la pérdida de actividad enzimática a pH neutro.

- 5 La Figura 3 representa los resultados de un ensayo de estabilidad térmica que utiliza calor para inducir la desnaturalización de proteína, que se verifica usando un colorante SYPRO Orange que emite fluorescencia al unirse a aminoácidos hidrófobos (que no están expuestos en una proteína plegada). 1-DNJ-HCl incrementa la termoestabilidad de GAA como es evidente por incrementos en la temperatura de fusión de GAA de un modo dependiente de la dosis. El experimento se efectuó a pH 7,4.
- 10 La Figura 4 representa los resultados de un ensayo de estabilidad térmica que utiliza calor para inducir la desnaturalización de proteína, que se verifica usando un colorante SYPRO Orange que emite fluorescencia al unirse a aminoácidos hidrófobos (que no están expuestos en una proteína plegada). La isofagomina incrementa la termoestabilidad de β -glucosidasa ácida como es evidente por incrementos en la temperatura de fusión de un modo dependiente de la dosis. El experimento se efectuó a pH 7,4.
- 15 La Figura 5 representa un experimento de estabilidad térmica de SYPRO Orange para verificar el despliegue de β -glucosidasa ácida (GCasa; Cerezyme[®]). Se incubó GCasa (2 μ M) en tampón de pH 7,4 o pH 5,2 con o sin IFG 10 μ M a 37°C y el despliegue de la proteína se verificó cada hora a lo largo de 24 horas. Estos resultados indican que la IFG puede prevenir la desnaturalización de GCasa a pH neutro.
- 20 La Figura 6 representa los resultados de un ensayo de estabilidad térmica que utiliza calor para inducir la desnaturalización de proteína, que se verifica usando un colorante SYPRO Orange que emite fluorescencia al unirse a aminoácidos hidrófobos (que no están expuestos en una proteína plegada). La 1-desoxigalactonojirimicina incrementa la estabilidad de α -Gal A (Fabrazyme[®]) de un modo dependiente de la dosis como es evidente por incrementos en la temperatura de fusión de α -Gal A. El experimento se efectuó a pH 7,4.
- 25 La Figura 7 representa el incremento en β -glucosidasa ácida, o las actividades de α -Gal A desde medios acondicionados de células COS-7 durante la expresión transitoria y la incubación con IGF o DGJ 100 μ M, respectivamente. Estos resultados demuestran que la incubación con una chaperona farmacológica conocida que se une a y estabiliza una proteína diana provoca incrementos en la actividad enzimática. Los incrementos en los niveles de actividad enzimática son un resultado de un incremento en la secreción de proteína de las proteínas diana y/o las prevención de la degradación y la inactivación de las proteínas secretadas desde los medios acondicionados. El
- 30 incremento en la actividad de β -glucosidasa ácida es específico para su chaperona farmacológica (IFG) ya que una chaperona farmacológica estructuralmente similar (DNJ) no provocaba cambio en la actividad de β -glucosidasa ácida en comparación con una transfección transitoria de control con vector vacío (EV, por sus siglas en inglés).

5. Descripción detallada

- 35 La presente invención proporciona métodos para mejorar la producción de β -glucosidasa ácida recombinante a través del uso de la chaperona farmacológica isofagomina para la proteína recombinante. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la chaperona farmacológica isofagomina puede estabilizar la enzima lisosómica β -glucosidasa ácida en una conformación que no se degrade en el retículo endoplásmico de una célula que expresa la enzima lisosómica. La invención también se basa en parte en el descubrimiento de que la unión de la chaperona farmacológica isofagomina a la enzima lisosómica isofagomina incrementa la estabilidad de la enzima
- 40 contra el estrés por temperatura y pH.

Por claridad y no a modo de limitación, esta descripción detallada se divide en las siguientes subporciones:

- (i) Definiciones;
- (ii) Trastornos de deficiencia de proteínas;
- (iii) Producción de proteínas recombinantes; y
- 45 (iv) Estabilidad in vitro.

5.1 Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados normales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se

analizan posteriormente, o en cualquier parte de la memoria descriptiva, para proporcionar directrices adicionales al profesional al describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo elaborarlos y usarlos.

El término "enzimoterapia reconstitutiva" o "ERT" (por sus siglas en inglés) se refiere a la introducción de una enzima purificada no natural en un individuo que tiene una deficiencia en tal enzima. La enzima administrada se puede obtener de fuentes naturales o mediante expresión recombinante. El término también se refiere a la introducción de una enzima purificada en un individuo que requiere o se beneficia de otro modo de la administración de una enzima purificada, p. ej., que sufre insuficiencia proteínica. La enzima introducida puede ser una enzima recombinante purificada producida *in vitro*, o una enzima purificada de tejido o fluido aislado, tal como, p. ej., placenta o leche de animal, o de plantas.

El término "estabilizar una conformación apropiada" se refiere a la capacidad de un compuesto o péptido u otra molécula para asociarse con una proteína silvestre, o a una proteína mutante que puede realizar su función silvestre *in vitro* e *in vivo*, de tal modo que la estructura de la proteína silvestre o mutante se pueda mantener como su forma natural o apropiada. Este efecto se puede manifestar prácticamente a través de uno o más de (i) un incremento del período de conservación de la proteína; (ii) una actividad superior por unidad/cantidad de proteína; o (iii) mayor eficacia *in vivo*. Se puede observar experimentalmente a través de un incremento de rendimiento desde el ER durante la expresión; mayor resistencia al despliegue debido a incrementos de temperatura (p. ej. según se determina en ensayos de estabilidad térmica), o la presencia de agentes caotrópicos, y por medios similares.

Según se usa en la presente, el término "centro activo" se refiere a la región de una proteína que tiene alguna actividad biológica específica. Por ejemplo, puede ser un centro que se une a un sustrato u otro sitio de unión y contribuye a los residuos de aminoácido que participan directamente en la formación y la ruptura de enlaces químicos. Los centros activos de esta invención pueden abarcar centros catalíticos de enzimas, centros de unión a antígeno de anticuerpos, dominios de unión a ligando de receptores, dominios de unión de reguladores o dominios de unión a receptor de proteínas secretadas. Los centros activos también pueden abarcar dominios de transactivación, interacción proteína-proteína o unión a ADN de factores de transcripción y reguladores.

Según se usa en la presente, los términos "chaperona farmacológica" o "chaperona sitioespecífica activa" se refieren a cualquier molécula, incluyendo una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un carbohidrato, etc., que interactúe específicamente de forma reversible con un centro activo de una proteína y mejore la formación de una conformación molecular estable. Según se usa en la presente, "chaperona sitioespecífica activa" no incluyen chaperonas generales endógenas presentes en el ER de células tales como Bip, calnexina o calreticulina, o chaperonas químicas inespecíficas generales tales como agua deuterada, DMSO o TMAO.

En una realización no limitativa, la chaperona sitioespecífica activa puede ser un "inhibidor competitivo" de una proteína o enzima, en donde un inhibidor competitivo se puede referir a un compuesto que se asemeja estructuralmente a la estructura química y la geometría molecular del sustrato enzimático al que se une la enzima en aproximadamente la misma localización que el sustrato. Así, el inhibidor compite por el mismo centro activo que la molécula del sustrato, incrementando así la K_m . La inhibición competitiva habitualmente es reversible si están disponibles suficientes moléculas de sustrato para desplazar el inhibidor, es decir, los inhibidores competitivos se pueden unir reversiblemente. Por lo tanto, la cantidad de inhibición enzimática depende de la concentración del inhibidor, la concentración del sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el centro activo.

El término "células hospedadora" significa cualquier célula de cualquier organismo que se seleccione, se modifique, se transforme, se desarrolle o se use o se manipule de cualquier modo, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo, la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima. En una realización, una célula hospedadora se transfecta con un vector que codifica una proteína que se puede usar para proteínoterapia reconstitutiva.

En otra realización no limitativa, la célula hospedadora puede ser una célula CHO, una célula HeLa, una célula HEK-293, una célula 293T, una célula COS, una célula COS-7, un mioblasto primario de ratón o una célula NIH 3T3.

El término "purificado", según se usa en la presente, se refiere a un material que se ha aislado bajo condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales naturales a partir de los que se obtiene el material. Por ejemplo, una proteína purificada preferiblemente está sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula; una molécula de ácido nucleico purificada preferiblemente está sustancialmente libre de proteínas u otras moléculas de ácido nucleico no relacionadas con las que se puede encontrar dentro de una célula. Según se usa en la presente, el término "sustancialmente libre" se usa funcionalmente, en el contexto de una prueba analítica del material. Preferiblemente, un 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 se puede evaluar mediante 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 segura a un ser humano o un animal no humano.

- 5 Según se usa en la presente, los términos "mutante" y "mutación" significan cualquier cambio detectable en el material genético, p. ej., ADN, o cualquier proceso, mecanismo o resultado de tal cambio. Esto incluye mutaciones génicas, en las que la estructura (p. ej., secuencia de ADN) de un gen se altera, cualquier gen o ADN que surja de cualquier proceso de mutación y cualquier producto de expresión (p. ej., ARN, proteína o enzima) es expresado por un gen o una secuencia de ADN modificados.
- 10 Según se usa en la presente, el término "proteína mutante" se refiere a proteínas traducidas de genes que contienen mutaciones genéticas que dan como resultado secuencias proteínicas alteradas. En una realización específica, tales mutaciones dan como resultado la incapacidad de la proteína para alcanzar su conformación natural bajo las condiciones normalmente presentes en el ER. El fallo para conseguir esta conformación da como resultado que estas proteínas se degraden, en lugar de ser transportadas a través de su ruta normal en el sistema de transporte proteínico hasta su localización apropiada dentro de la célula. Otras mutaciones pueden dar como resultado una disminución de la actividad o una renovación más rápida.
- 15 Según se usa en la presente, el término "gen silvestre" se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína capaz de tener una actividad funcional biológica normal in vivo. La secuencia de ácido nucleico silvestre puede contener cambios de nucleótidos que difieren de la secuencia publicada conocida, con tal de que los cambios den como resultado sustituciones de aminoácidos que tengan poco o ningún efecto sobre la actividad biológica. El término silvestre también puede incluir secuencias de ácido nucleico manipuladas para codificar una proteína capaz de incrementar o mejorar la actividad con relación a la proteína endógena o natural.
- 20 Según se usa en la presente, el término "proteína silvestre" se refiere a cualquier proteína codificada por un gen silvestre que sea capaz de tener actividad biológica funcional cuando se exprese o se introduzca in vivo. El término "actividad silvestre normal" se refiere a la función fisiológica normal de una proteína en una célula. Tal funcionalidad se puede probar mediante cualquier medio conocido para establecer la funcionalidad de una proteína.
- 25 El término "genéticamente modificado" se refiere a células que expresan un producto génico particular después de 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 se puede efectuar mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo dirección génica y recombinación homóloga. Según se usa en la presente, el término también incluye células que se han manipulado para expresar o sobreexpresar un gen o producto génico endógeno normalmente no expresado por tal célula, p. ej., mediante tecnología de activación génica.
- 30 La expresión "farmacéuticamente aceptable", siempre que se use en relación con las composiciones farmacéuticas de la invención, se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, según se usa en la presente, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o listado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. Se emplean preferiblemente como portadores agua o soluciones salinas en solución acuosa y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Portadores farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, 18ª Edición.
- 35
- 40 Los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a la cantidad de un compuesto que es suficiente para dar como resultado una respuesta terapéutica. En realizaciones en las que se administran en un complejo una ASSC y una enzima, los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se pueden referir a la cantidad del complejo que es suficiente para dar como resultado una respuesta terapéutica. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (p. ej., un profesional clínico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia. Así, una respuesta terapéutica será generalmente una mejora de uno o más síntomas o signos de una enfermedad o un trastorno.
- 45
- 50 Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las medidas. Grados de error ejemplares típicos están dentro de 20 por ciento (%), preferiblemente dentro de 10%, y más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo de valores dado. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 10 o 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente son aproximadas a menos que se indique otra cosa, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indique expresamente.
- 55 Se debe apuntar que una concentración de la ASSC que es inhibidora durante la producción in vitro, el transporte o el almacenamiento de la proteína terapéutica purificada puede constituir una "cantidad eficaz" para los propósitos de esta invención debido a la dilución (y el desplazamiento consiguiente en la unión debido al cambio en el equilibrio), la biodisponibilidad y el metabolismo de la ASSC durante la administración in vivo.

5.2 Trastornos de deficiencia de proteínas

Trastornos caracterizados por deficiencia de proteínas o enzimas, o pérdida de función en tejidos específicos, pueden ser tratados en teoría mediante proteínoterapia reconstitutiva. En tales trastornos, ciertas 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.

Los trastornos de deficiencia de proteínas o enzimas pueden estar provocados, por ejemplo, por una mutación en el gen que codifica la proteína o la enzima que da como resultado la expresión de una proteína o enzima que no es funcional, o tiene una función reducida o alterada. La deficiencia también puede estar provocada por una mutación en el gen de la proteína o la enzima que dé como resultado de poca a ninguna expresión de la proteína o la enzima (p. ej. una mutación completa).

Por otra parte, la deficiencia de enzima o proteína se puede deber a un trastorno de conformación, provocado por mutaciones que alteran el plegamiento de la proteína y el retardo de la proteína mutante en el ER, dando como resultado deficiencia de proteína. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, fibrosis quística, deficiencia de α 1-antitripsina, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Fabry, enfermedad de Alzheimer (Selkoe, *Annu. Rev. Neurosci.* 1994; 17:489-517), osteogénesis imperfecta (Chessler y cols., *J. Biol. Chem.* 1993; 268:18226-18233), síndrome de glicoproteínas con deficiencia de carbohidratos (Marquardt y cols., *Eur. J. Cell. Biol.* 1995; 66: 268-273), síndrome de Maroteaux-Lamy (Bradford y cols., *Biochem. J.* 1999; 341:193-201), ceguera hereditaria (Kaushal y cols., *Biochemistry* 1994; 33:6121-8), trombastenia de Glanzmann (Kato y cols., *Blood* 1992; 79:3212-8), deficiencia de factor VII hereditaria (Arbini y cols., *Blood* 1996; 87:5085-94), albinismo oculocutáneo (Halaban y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:5889-94) y deficiencia de proteína C (Katsumi, y cols., *Blood* 1996; 87:4164-75). Recientemente, una mutación en la enfermedad ligada al cromosoma X adrenoleucodistrofia (ALD) dio como resultado un plegamiento incorrecto del transportador de peroxisomas defectuoso que podría ser rescatado por cultivo a baja temperatura de células afectadas (Walter y cols., *Am J Hum Genet* 2001; 69:35-48). Generalmente, se acepta que las mutaciones tienen lugar uniformemente a lo largo de toda la secuencia de un gen. Por lo tanto, es predecible que el fenotipo resultante del plegamiento incorrecto de la proteína deficiente exista en muchos otros trastornos genéticos.

Muchos de los trastornos de deficiencia de proteína hereditarios son deficiencias enzimáticas. Una gran clase de trastornos enzimáticos hereditarios implica mutaciones en enzimas lisosómicas y se denominan trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD, por sus siglas en inglés). Los trastornos de almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades provocadas por la acumulación de glucoesfingolípidos, glucógeno y mucopolisacáridos. Ejemplos de trastornos lisosómicos incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Gaucher (Beutler y cols., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª ed. 2001 Scriver y cols., ed. pp. 3635-3668, McGraw-Hill, Nueva York), gangliosidosis GM1 (id. en pp. 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. pp. 2529-2561, McGraw-Hill, Nueva York), mucopolisacaridosis (id. en pp. 3421-3452), enfermedad de Pompe (id. en pp. 3389-3420), enfermedad de Hurler-Scheie (Weismann y cols., *Science* 1970; 169, 72-74), enfermedades de Niemann-Pick A y B, (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8ª ed. 2001. Scriver y cols. ed., pp. 3589-3610, McGraw-Hill, Nueva York), y enfermedad de Fabry (id. en pp. 3733-3774).

Enfermedad de Fabry

El término "enfermedad de Fabry" se refiere a un error innato ligado al cromosoma X del catabolismo de los glucoesfingolípidos debido a una actividad de α -galactosidasa A (α -Gal A) lisosómica deficiente. Este defecto provoca la acumulación de globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida) y glucoesfingolípidos relacionados en lisosomas endoteliales vasculares del corazón, los riñones, la piel y otros tejidos.

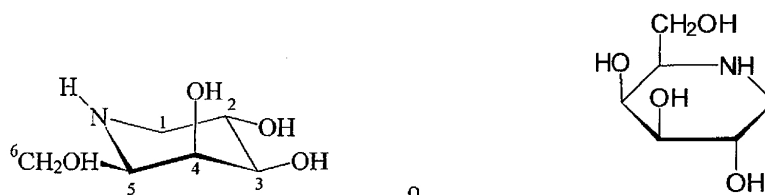
α -Galactosidasa A se refiere al gen *Gla* humano que comprende una secuencia de ácido nucleico descrita en el N° de Registro del GenBank NM_000169. Alternativamente, la α -galactosidasa A puede ser codificada por cualquier molécula de aminoácido que exhiba al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y hasta 100% de homología con el gen de α -galactosidasa A (según se determina mediante un software estándar, p. ej. BLAST o FASTA), y cualesquiera secuencias que se hibriden bajo condiciones estándar a estas secuencias.

α -Galactosidasa A (α -GAL A) humana se refiere a una enzima codificada por el gen *Gla* humano, o cualquier otra secuencia de aminoácidos al menos 90% homóloga con la misma. La enzima α -GAL humana consiste en 429 aminoácidos y está en los N° de Registro del GenBank U78027 y NP_000160.

El término "enfermedad de Fabry atípica" se refiere a pacientes con manifestaciones principalmente cardíacas de la deficiencia de α -GAL, a saber acumulación progresiva de globotriaosilceramida (GL-3) en células del miocardio que conduce a una dilatación significativa del corazón, particularmente el ventrículo izquierdo.

Una "portadora" es una mujer que tiene un cromosoma X con un gen de α -GAL defectuoso y un cromosoma X con un gen normal y en la que está presente inactivación del cromosoma X del alelo normal en uno o más tipos de célula. Una portadora a menudo está diagnosticada de enfermedad de Fabry.

Una chaperona farmacológica para α -galactosidasa A puede ser 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), en donde la DGJ es un compuesto que tiene las siguientes estructuras:



Este término incluye tanto la base libre como cualesquiera formas salinas, y cualesquiera profármacos de las mismas.

Otras chaperonas farmacológicas adicionales para α -GAL A se describen en las Patentes de EE. UU. N° 6.274.597, 6.774.135 y 6.599.919 de Fan y cols., e incluyen α -alo-homonojirimicina, β -1-C-butil-desoxigalactonojirimicina y α -galacto-homonojirimicina, calistegina A₃, calistegina B₂, calistegina B₃, N-metil-calistegina A₃, N-metil-calistegina B₂ y N-metil-calistegina B₃.

Enfermedad de Pompe

La enfermedad de Pompe es una LSD recesiva autosómica caracterizada por actividad de α -glucosidasa ácida (GAA; α -glucosidasa) deficiente que deteriora el metabolismo de glucógeno lisosómico. La deficiencia enzimática conduce a acumulación de glucógeno lisosómico y da como resultado debilidad progresiva de los músculos esqueléticos, reducción de la función cardíaca, insuficiencia respiratoria y/o deterioro del SNC en fases tardías de la enfermedad. Las mutaciones genéticas en el gen de GAA dan como resultado bien reducir la expresión o bien producir formas mutantes de la enzima con estabilidad alterada y/o una actividad biológica que conduce finalmente a la enfermedad. (véase generalmente Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver y cols., eds., McGraw-Hill, New York, 7ª ed., páginas 2443-2464). Las tres formas clínicas reconocidas de la enfermedad de Pompe (infantil, juvenil y adulta) se correlacionan con el nivel de actividad de α -glucosidasa residual (Reuser A J y cols., 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), Muscle & Nerve Supplement 3, S61-S69). Las ASSC (también denominadas en cualquier parte "chaperonas farmacológicas") representan un nuevo enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento de enfermedades genéticas, tales como trastornos del almacenamiento lisosómico (p. ej., enfermedad de Pompe).

α -Glucosidasa ácida (GAA) se refiere a un gen de glucosidasa humana, α , ácida (GAA) que comprende una secuencia de ácido nucleico descrita en los N° de Registro del GenBank NM_000152, NM_001079803 o NM_001079804. Alternativamente, la α -glucosidasa ácida puede ser codificada por cualquier molécula de ácido nucleico que exhiba al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y hasta 100% de homología con el gen de α -glucosidasa ácida (según se determina mediante un software estándar, p. ej. BLAST o FASTA), y cualesquiera secuencias que se hibriden bajo condiciones estándar a estas secuencias.

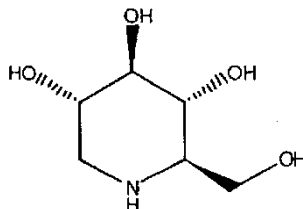
α -Glucosidasa ácida humana se refiere a una enzima que hidroliza polímeros de D-glucosa con enlaces α -1,4 y α -1,6 presentes en glucógeno, maltosa e isomaltosa. Nombres alternativos son como sigue: glucoamilasa; 1,4- α -D-glucano glucohidrolasa; amilogucosidasa; γ -amilasa; y exo-1,4- α -glucosidasa. El gen de GAA humana se ha cartografiado al cromosoma 17q25.2-25.3 y tiene una secuencia de aminoácidos descrita en los N° de Registro del GenBank Y00839, NP_000143, NP_001073271 o NP_001073272, o cualquier otra secuencia de aminoácidos al menos 90% homóloga con la misma.

La enfermedad de Pompe infantil (tipo I o A) es la más común y la más grave, caracterizada por retraso en el desarrollo, hipotonía generalizada, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardiorrespiratoria dentro del segundo año de vida. La enfermedad de Pompe juvenil (tipo II o B) es intermedia en gravedad y se caracteriza por una preponderancia de síntomas musculares sin cardiomegalia. Los individuos con enfermedad de Pompe juvenil habitualmente mueren antes de alcanzar 20 años de edad debido a insuficiencia respiratoria. La enfermedad de Pompe adulta (tipo III o C) a menudo se presenta como una miopatía lentamente progresiva en la adolescencia o tan tarde como en la década de los sesenta (Felice K J y cols., 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135).

En la enfermedad de Pompe, se ha observado que la α -glucosidasa se modifica mucho postraduccionalmente mediante glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico. La conversión del precursor de 110 kilodaltons (kDa) en formas maduras de 76 y 70 kDa mediante proteólisis en el lisosoma se requiere para la catálisis óptima de glucógeno.

Según se usa en la presente, el término "enfermedad de Pompe" se refiere a todos los tipos de enfermedad de Pompe. Las formulaciones y los regímenes de dosificación divulgados en esta solicitud se pueden usar para tratar, por ejemplo, enfermedad de Pompe Tipo I, Tipo II o Tipo III.

- 5 Una chaperona farmacológica para α -glucosidasa ácida puede ser 1-desoxinorjirimicina (1-DNJ), que se representa mediante la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster o un profármaco de la misma. En una realización, la sal es sal de hidrocloreuro (es decir 1-desoxinorjirimicina-HCl).

- 10 Otras chaperonas farmacológicas adicionales para α -glucosidasa ácida se describen en la Patente de EE. UU. N° 6.599.919 de Fan y cols., y la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2006/0264467 de Mugrage y cols., e incluyen α -homonorjirimicina y castanospermina.

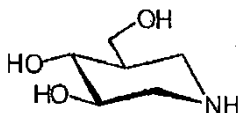
Enfermedad de Gaucher

- 15 Según se usa en la presente, el término "enfermedad de Gaucher" se refiere a una deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa que descompone glucocerebrosidos grasos. A continuación, la grasa se acumula, principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea. La enfermedad de Gaucher puede dar como resultado dolor, fatiga, ictericia, daño óseo, anemia e incluso la muerte. Hay tres fenotipos clínicos de la enfermedad de Gaucher. Los pacientes con Tipo 1 manifiestan, bien tempranamente en la vida o en la primera adultez, fácilmente moretones y experimentan fatiga debido a anemia, bajos niveles de plaquetas, dilatación del hígado y el bazo, debilitamiento del esqueleto, y en algunos casos tienen insuficiencia pulmonar y renal. No hay signos de implicación cerebral. En el
- 20 Tipo II, de comienzo temprano, la dilatación del hígado y el bazo se produce a los 3 meses de edad y hay una implicación cerebral intensiva. Hay una alta tasa de mortalidad a los 2 años. El Tipo III se caracteriza por dilatación del hígado y el bazo y ataques cerebrales. El gen de β -glucocerebrosidasa está situado en el cromosoma 1q21 humano. Su precursor proteínico contiene 536 aminoácidos y su proteína madura tiene una longitud de 497 aminoácidos.

- 25 En una realización no limitativa, glucocerebrosidasa se refiere al gen de glucosidasa de Homo sapiens, β (*Gba*) que comprende una secuencia de ácido nucleico descrita en los N° de Registro del GenBank NM_001005741, NM_001005741, NM_001005749, NM_001005750 o NM_000157. Alternativamente, la glucocerebrosidasa puede ser codificada por cualquier molécula de ácido nucleico que exhiba al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y hasta 100% de homología con el gen de glucocerebrosidasa (según se determina
- 30 mediante un software estándar, p. ej. BLAST o FASTA), y cualesquiera secuencias que se hibriden bajo condiciones estándar a estas secuencias.

En otra realización no limitativa, glucocerebrosidasa se refiere a una enzima codificada por el gen de glucosidasa humana β (*Gba*) (N° de Registro del GenBank NP_001005741, NP_001005742, NP_001005749, NP_001005750 o NP_000148), o cualquier otra secuencia de aminoácidos al menos 90% homóloga con el mismo.

- 35 En una realización no limitativa, una chaperona farmacológica para glucocerebrosidasa puede ser isofagomina (IFG; (3R,4R,SR)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidindiol), que tiene la siguiente estructura:



- 40 El tartrato de isofagomina se ha descrito recientemente en la Patente de EE. UU. N° 7.501.439 de propietario común, de Mugrage y cols., y se le ha asignado un número de CAS 919364-56-0. La isofagomina también se puede preparar en la forma de otras sales por adición de ácidos elaboradas con una variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos. Tales sales incluyen las formadas con cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido metanosulfónico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico y varios otros (p. ej., nitrato, fosfato, boratos, citratos, benzoatos, ascorbato, salicilato y similares). Tales sales se pueden formar como es conocido por los expertos en la técnica.

- 45 Otras chaperonas farmacológicas adicionales para glucocerebrosidasa se describen en las Patentes de EE. UU. N° 6.599.919 de Fan y cols., 6.046.214 de Kristiansen y cols., 5.844.102 de Sierks y cols., y la Publicación de Solicitud

de Patente de EE. UU. N° 2008/0009516 de Wustman, e incluyen C-bencilisofagomina y derivados, N-alquil(C9-12)-DNJ, glucoimidazol (y derivados), C-alquil-IFG (y derivados), N-alquil- β -valeinaminas, flufenozina, N-dodecil-DNJ y calisteginas A₃, B₁, B₂ y C₁.

- 5 Además de los trastornos hereditarios, otras deficiencias enzimáticas surgen del daño a un tejido o un órgano resultante de trastornos primarios o secundarios. Por ejemplo, el tejido pancreático dañado, o pancreatitis, que está provocado por alcoholismo da como resultado una deficiencia en enzimas pancreáticas necesarias para la digestión. La pancreatitis se está tratando actualmente usando enzimoterapia restitutiva.

10 Los trastornos de deficiencia de proteínas se pueden tratar mediante la administración de proteínas restitutivas para mejorar o estimular procesos biológicos. Por ejemplo, a los individuos con anemia se les administra eritropoyetina recombinante (EPOGEN[®], PROCRI[®], EPOIETIN[®]) para estimular la producción de glóbulos rojos e incrementar el transporte de oxígeno a los tejidos. Además, interferones recombinantes tales como interferón α 2b (INTRON A[®], PEG-INTRON[®] o REBETOL[®]) e interferón β 1a (AVONEX[®], BETASERON[®]) se administran para tratar la hepatitis B y la esclerosis múltiple, respectivamente. Otras proteínas adicionales administradas son desoxirribonucleasa humana recombinante I (rhDNase-PULMOZYME[®]), una enzima que escinde selectivamente ADN usada para mejorar la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística; hormona estimulante de tiroides recombinante (THYROGEN[®]) desarrollada para el uso en pacientes con cáncer de tiroides que se han sometido a tiroidectomía casi total o total, y que por lo tanto deben tomar hormonas tiroideas; G-CSF recombinante (NEUPOGEN[®]) para tratar la neutropenia procedente de quimioterapia, y enzimas digestivas en individuos con pancreatitis. Otra área significativa de la terapia proteínica es en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer con anticuerpos, que tienen un centro activo muy definido altamente específico. Productos terapéuticos de anticuerpo incluyen RESPIRGRAM[®] para el virus respiratorio sincicial, HERCEPTIN[®], para el cáncer de mama; REMICAID[®] y HUMIRA[®], para artritis y enfermedades inflamatorias, y otros. Las ASSC para anticuerpos son muy conocidas, y se pueden emplear bien el antígeno diana o bien un análogo estructuralmente relacionado (p. ej., una forma modificada de la diana activa o un mimético).

- 25 Un "paciente" se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado de o se sospecha que tiene una enfermedad particular. El paciente puede ser un ser humano o un animal. Por ejemplo, un "pacientes con enfermedad de Fabry" se refiere a un individuo que ha sido diagnosticado de o se sospecha que tiene enfermedad de Fabry y tiene un α -GAL mutada. Marcadores característicos de la enfermedad de Fabry se pueden presentar en hem cigotos macho y portadores hembra con la misma frecuencia, aunque las hembras típicamente están menos gravemente afectadas.

30 5.3 Producción de proteínas recombinantes

Las proteínas restitutivas útiles para tratar pacientes con una deficiencia de proteína, por ejemplo, a través de enzimoterapia restitutiva, se pueden aislar y purificar usando técnicas normales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia de la especialidad. Por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la proteína restitutiva se pueden aislar usando expresión de ADN recombinante según se describe en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (en la presente "Sambrook y cols., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. E. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel y cols. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994). El ácido nucleico que codifica la proteína puede ser de longitud completa o estar truncado, con tal de que el gen codifique una proteína biológicamente activa. Por ejemplo, una forma truncada biológicamente activa de α -Gal A, la enzima deficiente asociada con la enfermedad de Fabry, se ha descrito en la Pat. EE. UU. N° 6.210.666 de Miyamura y cols.

- 45 El gen identificado y aislado que codifica la proteína diana se puede insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Se puede usar un gran número de sistemas vector-hospedador conocidos en la especialidad. Posibles vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema vectorial debe ser compatible con la célula hospedadora usada. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, E. coli, bacteriófagos tales como derivados de λ , 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 efectuar, por ejemplo, al ligar el fragmento de ADN en un vector de clonación que tiene términos cohesivos complementarios. Sin embargo, si los centros de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN se pueden modificar enzimáticamente. Alternativamente, se puede producir cualquier sitio deseado al ligar secuencias de nucleótidos (conectores) a los términos del ADN; estos conectores ligados pueden comprender oligonucleótidos químicamente sintetizados específicos que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción. La producción de la proteína recombinante se puede maximizar mediante manipulaciones genéticas tales como incluir un péptido de señal en el término N para facilitar la secreción o una secuencia no traducida 3' que contienen un centro de poliadenilación.

Las construcciones usadas para transducir células hospedadoras son vectores derivados de virus, incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus de las paperas, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis y virus variolovacunal.

5 Las moléculas recombinantes se pueden introducir en las células hospedadoras a través de transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de modo que se generan muchas copias de la secuencia génica. Preferiblemente, el gen clonado está contenido en un plásmido vectorial lanzadera, que proporciona expansión en una célula en clonación, p. ej., E. coli, y una purificación fácil para la inserción posterior en una línea celular de expresión apropiada, si esto se desea.

10 Sistemas hospedador-vector potenciales incluyen, pero no se limitan a, sistemas de celulares de mamífero infectados con virus (p. ej., virus variolovacunal, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insecto infectados con virus (p. ej., baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus intensidades y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, se puede usar uno cualquiera de un número de elementos de transcripción y traducción adecuados. Las diferentes
15 células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación traduccional y postraduccional (p. ej., glicosilación, escisión [p. ej., de la secuencia de señal]) de proteínas. Líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados se pueden elegir para asegurar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína extraña expresada, tal como glicosilación, sialiación y fosforilación. Por ejemplo, se puede usar la expresión en un sistema bacteriano para producir un producto de proteína de núcleo no glicosilado. Sin embargo, una proteína expresada en bacterias no se puede plegar apropiadamente. La expresión en levadura puede producir un producto glicosilado. La expresión en células eucarióticas puede incrementar la probabilidad de glicosilación y plegamiento "naturales" de una proteína heteróloga. Por otra parte, la expresión en células de mamífero puede proporcionar una herramienta para reconstituir, o constituir, una proteína.

25 La purificación de una proteína expresada recombinantemente se puede alcanzar usando métodos conocidos en la especialidad tales como precipitación con sulfato amónico, cromatografía en columna que contiene resinas de interacción hidrófoba, resinas de intercambio de cationes, resinas de intercambio de aniones y resinas de cromatoenfoco. Alternativamente, se puede usar cromatografía de inmuoafinidad para purificar la proteína recombinante usando un anticuerpo policlonal o monoclonal apropiado que se une específicamente a la proteína, o a un marcador que está fusionado a la proteína recombinante. En una realización preferida, la pureza de la proteína recombinante usada para el método de la presente invención será al menos 95%, preferiblemente al menos 97% y lo más preferiblemente, mayor de 98%.

30 Las proteínas reconstitutivas útiles para tratar pacientes con una deficiencia de proteína, por ejemplo, a través de enzimoterapia reconstitutiva, se pueden purificar de un sistema de expresión celular recombinante (p. ej., células de mamífero o células de insecto - véanse, generalmente, la Pat. EE. UU. N° 5,580.757 de Desnick y cols.; las Pat. EE. UU. N° 6.395.884 y 6.458.574 de Selden y cols.; la Pat. EE. UU. N° 6.461.609 de Calhoun y cols.; la Pat. EE. UU. N° 6.210.666 de Miyamura y cols.; la Pat. EE. UU. N° 6.083.725 de Selden y cols.; la Pat. EE. UU. N° 6.451.600 de Rasmussen y cols.; la Pat. EE. UU. N° 5.236.838 de Rasmussen y cols.; y la Pat. EE. UU. N° 5.879.680 de Ginns y cols.), placenta humana o leche de animal (véase la Pat. EE. UU. N° 6.188.045 de Reuser y cols.).

40 Otras técnicas de síntesis para obtener la proteína reconstitutiva adecuada para uso farmacéutico se pueden encontrar, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N° 7.423.135, 6.534.300 y 6.537.785; la Solicitud Publicada Internacional N° 2005/077093 y las Solicitudes Publicadas de EE. UU. N° 2007/0280925 y 2004/0029779. Estas referencias se incorporan en la presente mediante referencia en su totalidad para todos los propósitos.

45 Por otra parte, diferentes sistemas de expresión de vector/hospedador pueden afectar a reacciones de procesamiento, tales como escisiones proteolíticas, en un grado diferente. La eficacia de la expresión se puede incrementar mediante el uso de una chaperona específica, según se describe en la Pat. EE. UU. N° 6.274.597, y miembros de la familia relacionados.

50 Según se apunta anteriormente, un aspecto de la presente invención proporciona un método para mejorar la producción de una proteína recombinante, método que comprende poner en contacto una célula hospedadora que expresa la proteína recombinante β -glucosidasa ácida con la chaperona farmacológica isofagomina específica para la proteína recombinante.

55 En una realización no limitativa, la chaperona farmacológica puede estabilizar una proteína recombinante diana en el ER de una célula que expresa la proteína, y evitar la ERAD y la degradación prematura de la proteína. Al hacer esto, la chaperona farmacológica puede reducir el estrés del ER asociado con la expresión de la proteína recombinante, lo que a su vez puede permitir que la línea celular de producción mantenga una alta viabilidad y expresión de la proteína.

En otras realizaciones no limitativas, la chaperona farmacológica puede estabilizar una proteína recombinante expresada por una célula, e incrementar la exportación de la proteína fuera del ER de la célula e incrementar la secreción de la proteína fuera de la célula.

5 En otras realizaciones no limitativas, la chaperona farmacológica puede estabilizar una proteína recombinante diana fuera de una célula que expresa la proteína (es decir, después de que la proteína se haya secretado al medio de cultivo celular). Al estabilizar la proteína recombinante, la chaperona farmacológica puede conferir un beneficio a proteínas que normalmente se deben almacenar a un pH inferior para conservar la estabilidad, y habitualmente no son estables en la mayoría de los medios de cultivo celular que típicamente se formulan a pH neutro. Pueden resultar pérdidas significativas en la actividad enzimática mientras estas proteínas permanecen en el medio de cultivo celular antes de la recogida y la purificación. Las chaperonas farmacológicas pueden estabilizar estas proteínas y evitar la desnaturalización y la inactivación irreversibles de la actividad de la proteína en medios con un pH mayor de 5,0, por ejemplo, a un pH neutro.

10 En otras realizaciones no limitativas, la chaperona farmacológica puede proteger a una proteína recombinante diana durante la purificación de la proteína del medio de cultivo. Si una proteína recombinante no es estable en el medio, se puede desnaturalizar y ser sensible a proteólisis por proteasas contaminantes en las mezclas de purificación. Las chaperonas farmacológicas pueden evitar esta proteólisis al estabilizar la proteína y evitar que los centros proteolíticos se revelen. Por lo tanto, la chaperona farmacológica puede mejorar la integridad de la proteína y/o la actividad de la enzima durante el procedimiento de purificación.

15 En otras realizaciones no limitativas, la chaperona farmacológica puede proteger a una proteína recombinante durante el almacenamiento y/o la preparación de una formulación farmacéutica. Por ejemplo, una chaperona farmacológica puede unirse a e inhibir la actividad enzimática de factores de coagulación (p. ej. proteasas) para asegurar que tales proteínas sean digeridas proteolíticamente durante el almacenamiento y la formulación. Las chaperonas farmacológicas también pueden evitar otros tipos de daño químico irreversible (p. ej., oxidación, hidrólisis o desamidación), o inestabilidad física, tal como agregación, precipitación y adsorción a superficies, durante la formulación. Además, la chaperona farmacológica puede estabilizar y proteger a la proteína de estreses tales como pH, temperatura, estrés por cizalladura, estrés por congelación/descongelación y combinaciones de estos estreses, que de otro modo pueden contribuir a la degradación de la proteína.

20 La proteína reconstitutiva puede ser una α -glucosidasa ácida (GAA) recombinante, codificada por el más predominante de nueve haplotipos observados de este gen y se produce mediante tecnología de ADN recombinante en una línea celular de ovario de hámster chino. La GAA recombinante puede ser, por ejemplo, una GAA recombinante como la descrita en Kakkis y cols., 2008, "An improved α -glucosidase enzyme for Pompe disease," Abstract, 58th Annual Meeting of the ASHG; Kishnani y cols., 2007, *Neurology*. 68(2):99-109; las Patentes de EE. UU. N° 6.118.045 de Reuser y cols., 7.056.712 de Chen y 7.351.410 de van Bree, cada una de las cuales se incorpora mediante referencia en su totalidad para todos los propósitos.

25 La ASSC puede ser 1-desoxinorjirimicina (1-DNJ) y la GAA puede ser GAA recombinante. Alternativamente, la ASSC puede ser α -homonorjirimicina y la GAA puede ser GAA recombinante.

30 La ASSC puede ser castanospermina y la GAA puede ser una GAA recombinante. La ASSC (p. ej. 1-desoxinorjirimicina, α -homonorjirimicina y castanospermina) se puede obtener a partir de bibliotecas sintéticas (véase, p. ej., Needels y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:10700-4; Ohlmeyer y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:10922-10926; Lam y cols., *Publicación PCT* N° WO 92/00252; Kocis y cols., *Publicación PCT* N° WO 94/28028) que proporcionan una fuente de ASSC potenciales según la presente invención. Bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, N.J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Microsource (New Milford, Conn.). Una biblioteca química excepcional está disponible de Aldrich (Milwaukee, Wis.). Alternativamente, bibliotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles de, p. ej., Pan Laboratories (Bothell, Wash.) o MycoSearch (NC), o son fácilmente producibles. Adicionalmente, bibliotecas y compuestos naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente a través de Res. 1986; 155:119-29.

45 5.4 Estabilidad in vitro

Asegurar la estabilidad de una formulación de proteína reconstitutiva durante su período de conservación es un reto importante. Por ejemplo, los viales de enzima recombinante a menudo son para un solo uso y el producto no utilizado se debe descartar. Adicionalmente, la enzima recombinante a menudo debe ser reconstituida, diluida y administrada por un profesional sanitario, y esa administración debe efectuarse sin retraso. A menudo, las enzimas recombinantes se deben almacenar a bajas temperaturas, por ejemplo, de 2 a 8°C, y el producto sólo es estable durante una cantidad de tiempo limitada, por ejemplo, hasta 24 horas.

50 Cuando la ASSC y la proteína reconstitutiva están presentes en la misma composición, las composiciones formuladas de la invención proporcionan composiciones más estables. Además de estabilizar la proteína administrada in vivo, la ASSC se une a y estabiliza reversiblemente la conformación de la proteína reconstitutiva in vitro, evitando de ese modo la agregación y la degradación, y prolongando el período de conservación de la formulación. El análisis de la interacción ASSC/proteína reconstitutiva se puede evaluar usando técnicas muy conocidas en la especialidad, tales como, por ejemplo, calorimetría de barrido diferencial o dicroísmo circular.

- Por ejemplo, cuando una formulación acuosa inyectable de la composición se suministra en un vial con tapón para la retirada del contenido usando una aguja y una jeringa, la presencia de una ASSC inhibe la agregación de la proteína reconstitutiva. El vial podría ser bien para un solo uso o bien para múltiples usos. La formulación también se puede suministrar como una jeringa precargada. En otra realización, la formulación está en un estado seco o liofilizado, que requeriría la reconstitución con un patrón o un diluyente fisiológico suministrado hasta un estado líquido. En este caso, la presencia de una ASSC estabilizaría la proteína reconstitutiva durante y después de la reconstitución para evitar la agregación. Cuando la formulación es un líquido para la administración intravenosa, tal como en una bolsa estéril para la conexión a un conducto o catéter para administración intravenosa, la presencia de una ASSC conferiría el mismo beneficio.
- Además de estabilizar la proteína reconstitutiva que se va a administrar, la presencia de una ASSC puede permitir que la formulación de proteína reconstitutiva se almacene a un pH neutro de alrededor de 7,0-7,5. Esto conferirá un beneficio a proteínas que normalmente se deben almacenar a un pH inferior para conservar la estabilidad. Por ejemplo, las enzimas lisosómicas, tales como GAA, típicamente retienen una conformación estable a un pH bajo (p. ej., 5,0 o inferior). Sin embargo, el almacenamiento prolongado de la enzima reconstitutiva a un pH bajo puede acelerar la degradación de la enzima y/o la formulación.

6. Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, presentados posteriormente.

Ejemplo 1: Estabilidad de α -glucosidasa ácida con ataque térmico

La estabilidad de GAA humana recombinante (Myozyme®, Genzyme Corp.) con y sin 100 μ M de la ASSC hidrocloreuro de 1-desoxinorjirimicina (DNJ) se determinó a través de un ensayo de estabilidad térmica que utiliza calor para inducir la desnaturalización de proteínas. La desnaturalización se verifica usando un colorante SYPRO Orange que emite fluorescencia al unirse a aminoácidos hidrófobos (que no están expuestos en una proteína plegada).

La estabilidad térmica se interpretó a pH 7,4 para dos formulaciones, que corresponden al pH del ER. Según se muestra en la Figura 1, la formulación que contiene 100 μ M de DNJ a pH 7,4 requería significativamente más calor para la desnaturalización, y así es más estable, en comparación con la formulación sin la ASSC a pH 7,4.

Ejemplo 2: La 1-desoxinorjirimicina (DNJ) evita la pérdida de actividad de α -glucosidasa ácida durante la incubación prolongada a 37°C

La actividad de GAA residual se determinó para cuatro formulaciones:

- (1) Myozyme sola a pH 7,4;
- (2) Myozyme más DNJ 50 μ M a pH 7,4;
- (3) Myozyme sola a pH 5,2;
- (4) Myozyme más DNJ 50 μ M a pH 5,2.

La actividad se midió, basándose en el % de actividad inicial ($t=0$) a lo largo de 24 horas. Se ensayó la actividad de la enzima GAA de las muestras basándose en la hidrólisis del sustrato fluorogénico 4-MU- α -glucosa a las 0, 3, 6 y 24 horas. La actividad de GAA se expresó como % de la actividad inicial, es decir actividad residual.

Según se muestra en la Figura 2A, la formulación (1) anterior (sin la ASSC) perdía actividad a lo largo del tiempo, teniendo solamente alrededor de 20% de su actividad inicial 24 horas después de la administración. En contraste, la formulación (2) mantenía la mayoría, si no la totalidad, de su actividad inicial a lo largo de 24 horas. Ambas formulaciones a pH 5,2 (formulaciones (3) y (4) anteriores) mantenían la mayoría de su actividad inicial a lo largo de 24 horas.

A fin de determinar si la pérdida de actividad enzimática inicial se correlaciona con un fallo para mantener una conformación apropiada, se realizó un experimento de estabilidad térmica de SYPRO Orange sobre las muestras anteriores según se describe generalmente en el Ejemplo 1. En este experimento de estabilidad térmica, la concentración de DNJ se disminuyó hasta 10 μ M en las formulaciones (2) y (4). Basándose en este experimento, se estimó el % de GAA plegada y se representó en la Figura 2B. La disminución en la cantidad de GAA plegada a lo largo de 24 horas en la Figura 2B para la formulación (1) se correlaciona con la pérdida de actividad mostrada en la Figura 2A para esta misma formulación general.

Ejemplo 3: La DNJ incrementa la estabilidad de GAA durante el ataque térmico

Un experimento de estabilidad térmica como el descrito generalmente en el Ejemplo 1 se realizó sobre cuatro composiciones:

- (1) Composición solamente de Myozyme;
- 5 (2) Myozyme más 1 μM de 1-DNJ-HCl;
- (3) Myozyme más 10 μM de 1-DNJ-HCl;
- (4) Myozyme más 100 μM de 1-DNJ-HCl;

10 Según se muestra en la Figura 3, el DNJ-HCl incrementa la termoestabilidad de GAA como es evidente por los incrementos en la temperatura de fusión de GAA, de un modo dependiente de la dosis.

Ejemplo 4: La isofagomina (IFG) incrementa la estabilidad de β -glucosidasa ácida durante el ataque térmico

Un experimento de estabilidad térmica como el descrito generalmente en el Ejemplo 1 se realizó sobre tres composiciones de GCasa (Cerezyme[®]):

- (1) Composición solamente de GCasa; pH 7,4
- 15 (2) GCasa más 10 μM de IFG; pH 7,4
- (3) GCasa más 100 μM de IFG; pH 7,4

Según se muestra en la Figura 4, la IFG incrementa la estabilidad térmica de GCasa de un modo dependiente de la dosis, como es evidente por los incrementos en la temperatura de fusión de la proteína.

Ejemplo 5: Estabilidad térmica de GCasa en presencia de IFG

20 El porcentaje de GCasa desplegada se determinó para tres formulaciones:

- (1) GCasa sola a pH 5,2
- (2) GCasa sola a pH 7,4;
- (3) GCasa con IFG 10 μM ; pH 7,4

25 Para determinar si la IFG evitaba el despliegue de GCasa a 37°C y pH neutro, se realizó un experimento de estabilidad de SYPRO Orange sobre las muestras anteriores según se describe generalmente en el Ejemplo 1. En este experimento de estabilidad térmica, la concentración de IFG era 10 μM en la formulación (3). Basándose en los resultados de la Figura 5, la IFG evitaba el despliegue de GCasa bajo las condiciones especificadas.

Ejemplo 6: La 1-desoxigalactonorjirimicina (DGJ) incrementa la estabilidad de α -Gal A durante el ataque térmico

30 Un experimento de estabilidad térmica como el descrito generalmente en el Ejemplo 1 se realizó sobre tres composiciones de α -Gal A (Fabrazyme[®]):

- (1) Composición solamente de α -Gal A; pH 7,4
- (2) α -Gal A más 10 μM de DGJ; pH 7,4
- (3) α -Gal A más 100 μM de DGJ; pH 7,4

35 Según se muestra en la Figura 6, la DNJ incrementa la estabilidad térmica de α -Gal A de un modo dependiente de la dosis como es evidente por los incrementos en la temperatura de fusión de la proteína.

Ejemplo 7: Las chaperonas farmacológicas incrementan los niveles de actividad de proteína recombinante a partir de células COS-7 transfectadas transitoriamente

5 Células COS-7 se transfectaron transitoriamente con vector vacío, un plásmido que codifica para el gen de GBA o un plásmido que codifica para el gen de GLA. Las diversas transfecciones transitorias se incubaron con 100 μ M de las chaperonas farmacológicas indicadas (IFG, DGJ o DNJ). Después de 48 horas de expresión de proteína, se recogió el medio acondicionado de cada transfección y se determinó el nivel de actividades de β -glucosidasa ácida o α -Gal A después de la captura de proteínas secretadas con cuentas de concanavalina A-agarosa. Esta etapa de
10 captura en concanavalina A era necesaria para eliminar la inhibición potencial de actividades enzimáticas por las chaperonas farmacológicas durante el curso de la determinación de la actividad usando los sustratos fluorogénicos apropiados (4-MU- β -glucosa para GCasa; 4-MU- β -galactosa para α -Gal A).

Según se muestra en la Figura 7, la incubación con IFG o DGJ incrementaba las actividades de β -glucosidasa ácida o α -Gal A, respectivamente. Cuando la DNJ se incubaba en la expresión transitoria de β -glucosidasa ácida, no se observaba incremento en la actividad de la enzima. Esta observación indica que los incrementos en la actividad de la enzima se deben a interacciones específicas con una chaperona farmacológica y/o un inhibidor de la proteína
15 conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la producción de una proteína de β -glucosidasa ácida recombinante, método que comprende
- 5 poner en contacto una célula hospedadora in vitro con isofagomina, en donde la célula hospedadora expresa la proteína recombinante; y
- purificar la β -glucosidasa ácida del medio de cultivo celular después de la secreción por la célula huésped, en donde la isofagomina estabiliza la proteína de β -glucosidasa ácida durante la purificación.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora es una célula de mamífero.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en
- 10 células CHO, células HeLa, células HEK-293, células 293T, células COS, células COS-7, mioblastos primarios de ratón y células NIH 3T3.
4. El método según la reivindicación 1, en el que el contacto de una célula hospedadora con la isofagomina estabiliza la proteína en una conformación silvestre apropiada que no se degrada en el retículo endoplásmico de la célula.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el contacto de una célula hospedadora con la isofagomina reduce el estrés del retículo endoplásmico asociado con la sobreexpresión de la proteína recombinante.
- 15 6. El método según la reivindicación 1, en el que el contacto de una célula hospedadora con la isofagomina incrementa la exportación de la proteína fuera del retículo endoplásmico de la célula.
7. El método según la reivindicación 1, en el que el contacto de una célula hospedadora con la isofagomina incrementa la secreción de la proteína fuera de la célula.
- 20 8. El método según la reivindicación 1, en el que el contacto de una célula hospedadora con la isofagomina incrementa la estabilidad de la proteína a un pH mayor de 5,0.
9. El método según la reivindicación 1, que comprende además almacenar la β -glucosidasa ácida recombinante purificada en un medio que tiene un pH mayor de 5,0; en donde el medio contiene isofagomina para estabilizar la β -glucosidasa ácida y prevenir la desnaturalización y la inactivación irreversibles de la actividad de la proteína.
- 25 10. El método según la reivindicación 1, en el que la β -glucosidasa ácida recombinante se purifica para que sea al menos 95% pura.
11. El método según la reivindicación 1, en el que la purificación de la β -glucosidasa ácida recombinante comprende precipitación con sulfato amónico, cromatografía en columna que contiene una resina de interacción hidrófoba,
- 30 poner en contacto la β -glucosidasa ácida silvestre humana recombinante con una resina de intercambio de cationes, poner en contacto la β -glucosidasa ácida silvestre humana recombinante con una resina de intercambio de aniones o poner en contacto la β -glucosidasa ácida silvestre humana recombinante con una resina de cromatoenfoque.
12. Un método según la reivindicación 1, método que comprende poner en contacto una célula hospedadora CHO que expresa la β -glucosidasa recombinante con isofagomina o una sal de la misma; y
- 35 purificar la β -glucosidasa ácida del medio de cultivo celular después de la secreción por la célula hospedadora, en donde la isofagomina o la sal de la misma estabiliza la β -glucosidasa ácida durante la purificación.

Figura 1

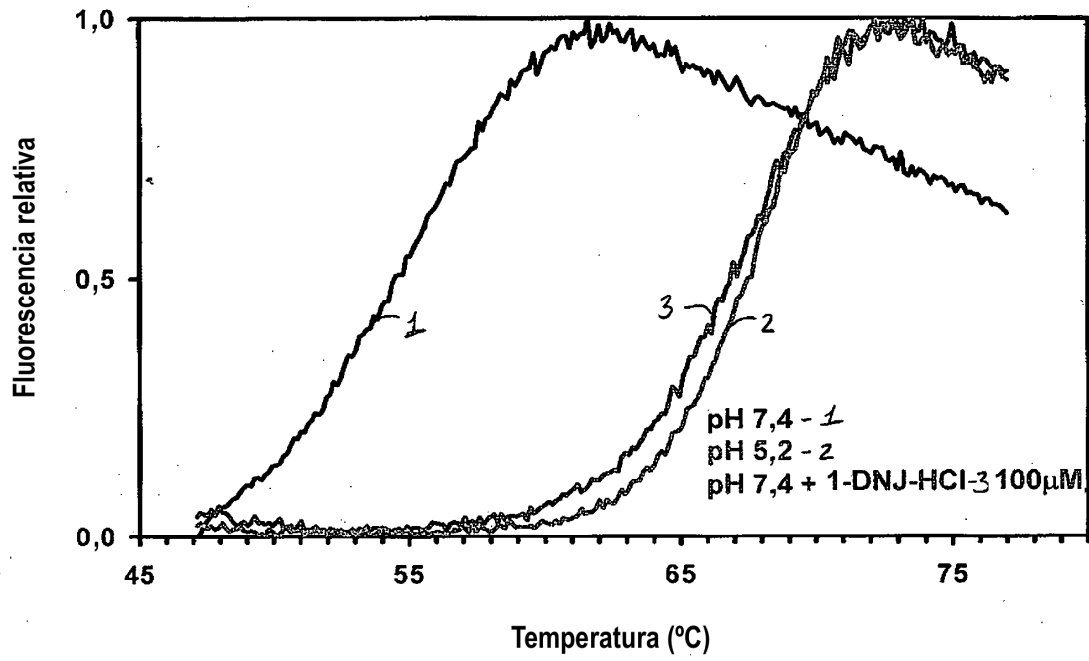


Figura 2A

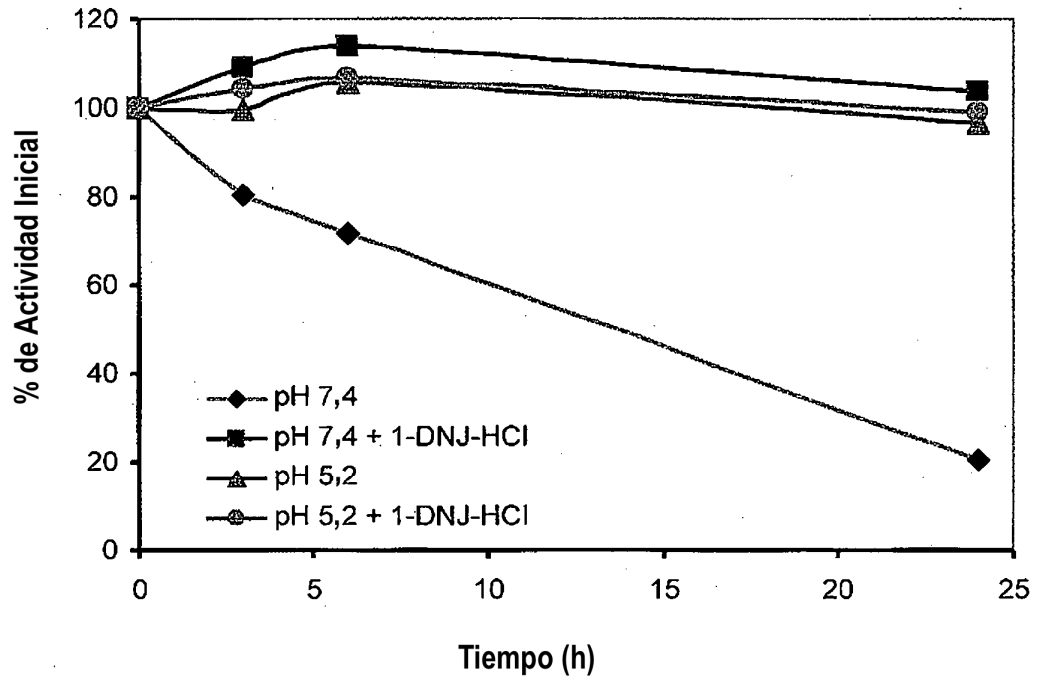


Figura 2B

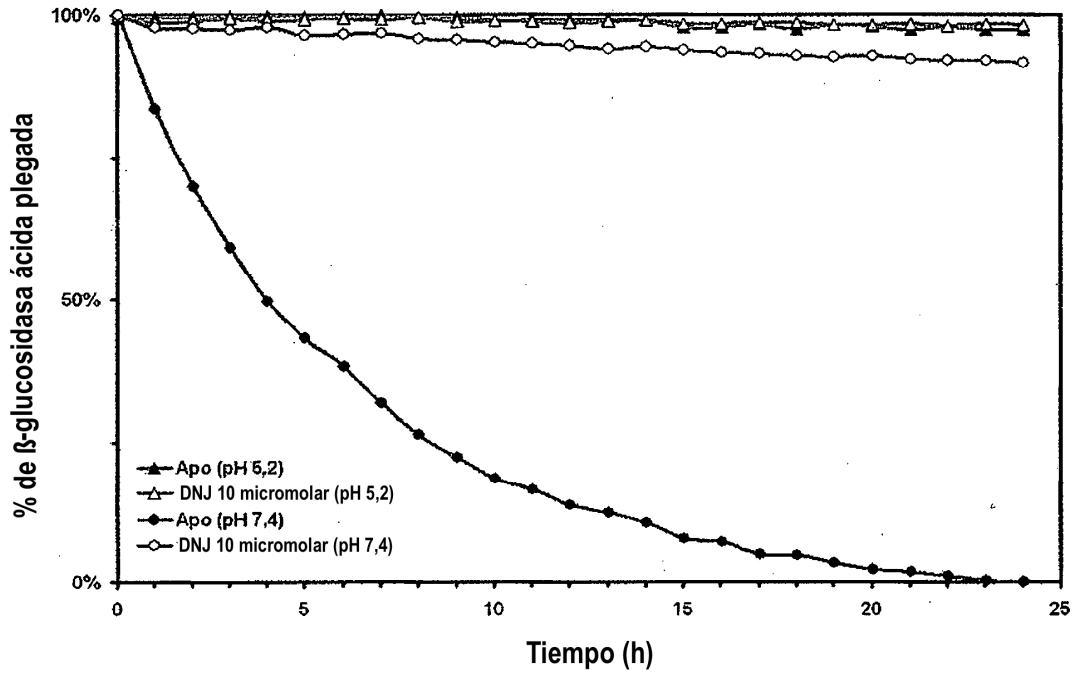


Figura 3

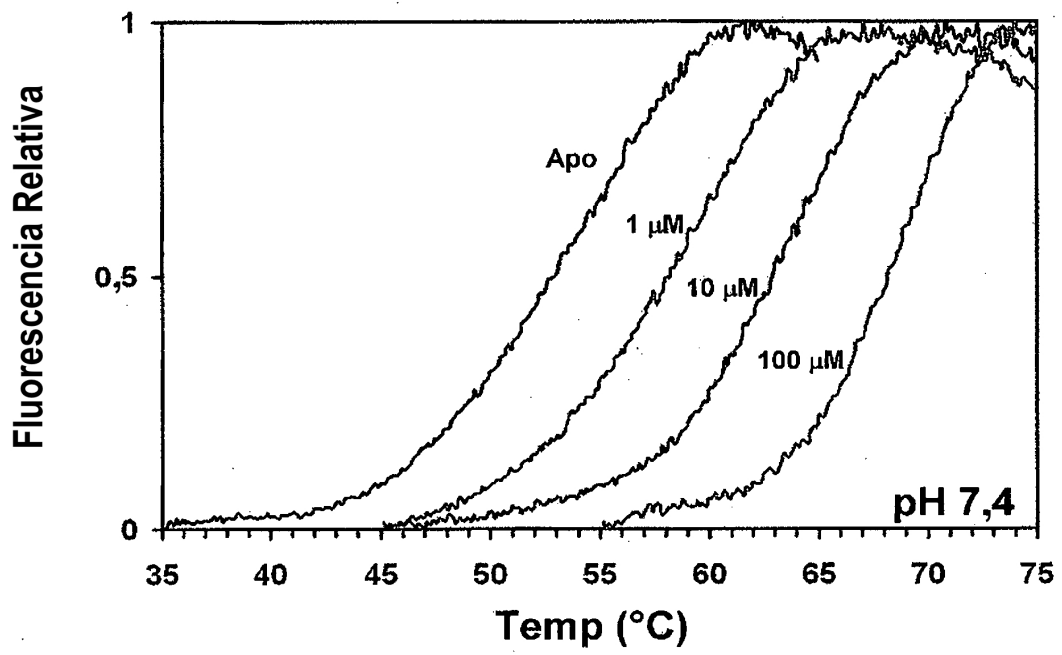


Figura 4

Estabilidad Térmica de β -Glucosidasa Ácida

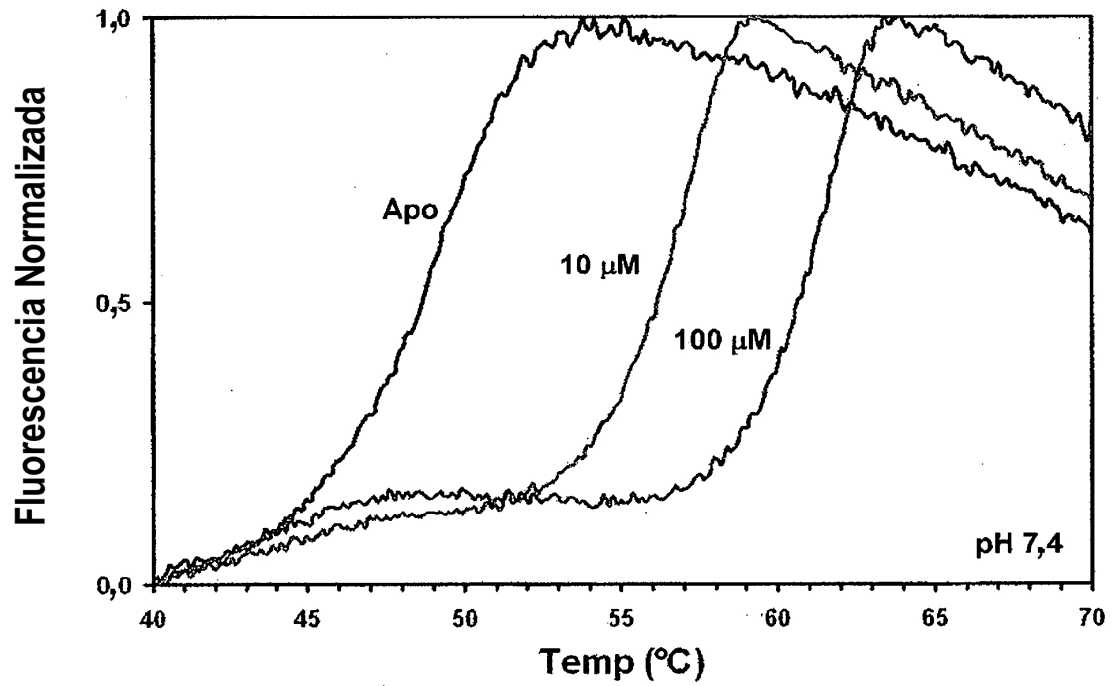


Figura 5

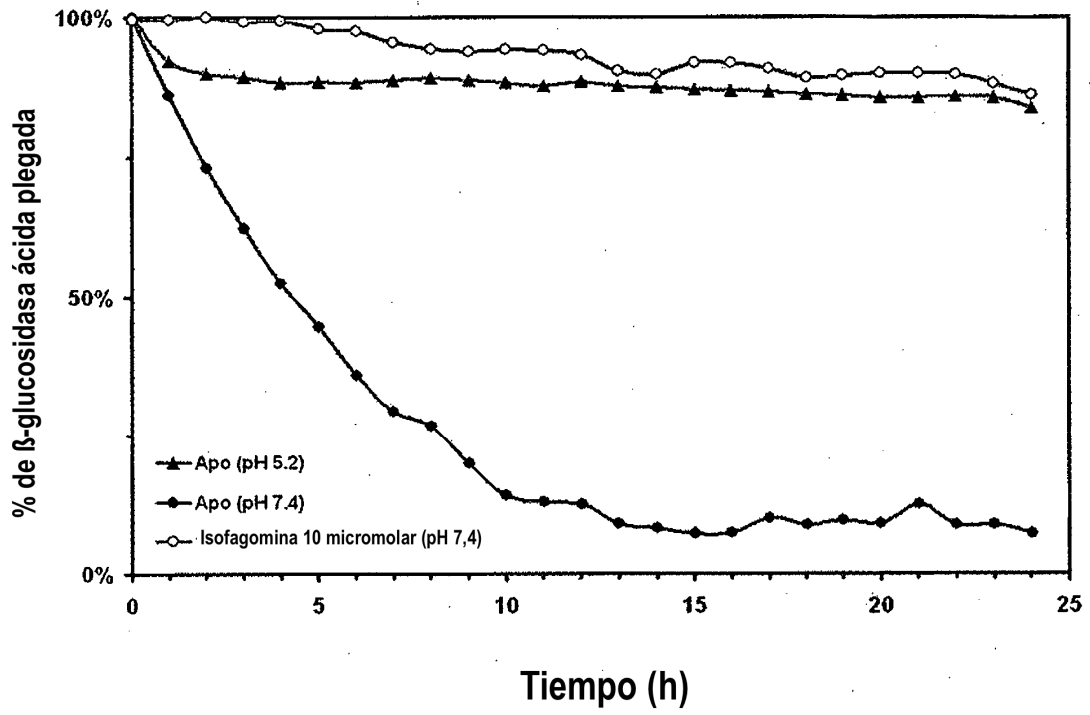


Figura 6

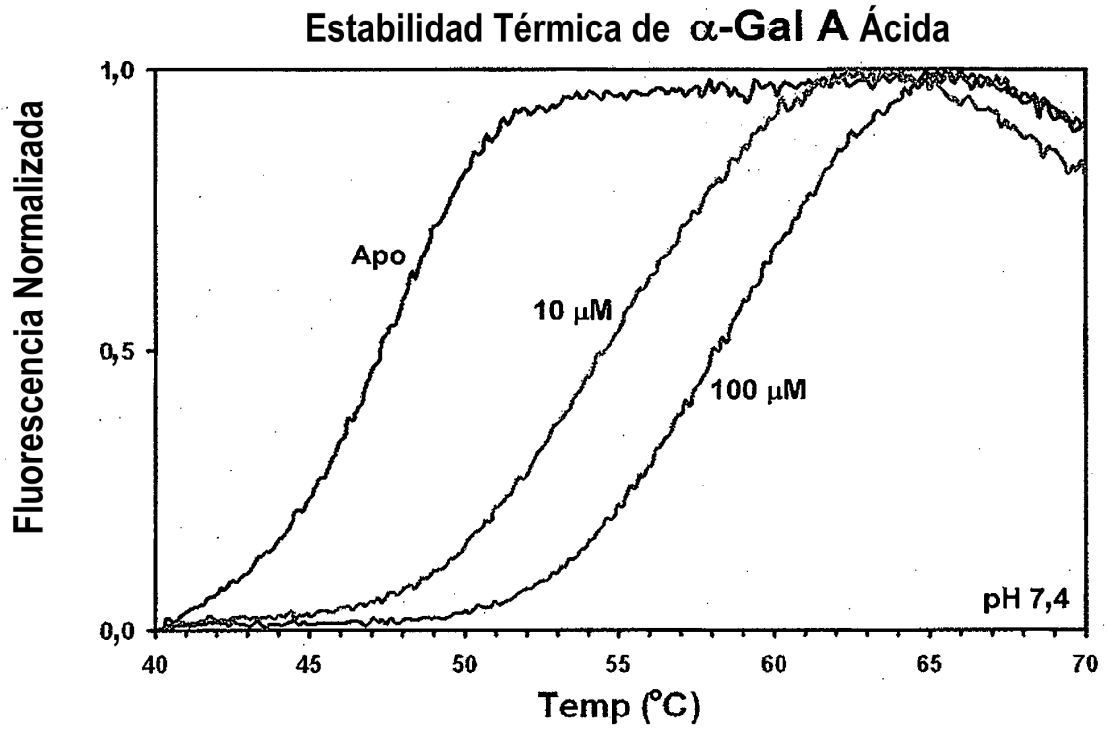


Figura 7

