

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 263**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011 PCT/US2011/045011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO2012012718**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11751689 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2595650**

54 Título: **Fabricación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana, altamente fosforilada, activa, y usos de la misma**

30 Prioridad:

22.07.2010 US 366714 P

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

12.06.2017

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**KOPPAKA, VISH;
VELLARD, MICHEL, CLAUDE;
OKHAMAFE, AUGUSTUS, O. y
ARAYA, KIDISTI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 616 263 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

Fabricación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana, altamente fosforilada, activa, y usos de la misma

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Campo de la invención

10 La presente invención está relacionada con los campos técnicos de la biología celular y molecular y de la medicina, particularmente con la fabricación de enzimas sulfatasas lisosomales humanas, altamente fosforiladas, activas y con su uso en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal asociadas a deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal. En particular, la presente invención está relacionada con la fabricación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, altamente fosforilada, activa y con su uso en el tratamiento de la Mucopolisacaridosis IVa (MPS IVa o síndrome de Morquio A) y otras enfermedades por depósito lisosomal asociadas a una deficiencia de GALNS.

Antecedentes de la invención

20 Las enfermedades por depósito lisosomal (LSD, por las siglas en inglés *Lysosomal Storage diseases*) se producen por la deficiencia de enzimas lisosomales específicas dentro de la célula que son esenciales para la degradación de residuos celulares en el lisosoma. Una deficiencia de dichas enzimas lisosomales conduce a la acumulación en el lisosoma de "material de depósito" no degradado, que causa hinchazón y mal funcionamiento de los lisosomas y, finalmente, a daño celular y tisular. Se ha identificado una gran cantidad de enzimas lisosomales y se han correlacionado con sus enfermedades relacionadas. Una vez que se ha identificado la enzima que falta, el tratamiento puede reducirse al único problema de suministrar de un modo eficaz una enzima de reemplazo a los tejidos afectados de los pacientes.

30 Una forma de tratar las enfermedades por depósito lisosomal es con terapia de reemplazo enzimático (ERT, *Enzymatic Replace Therapy*) intravenosa (Kakkis, Expert Opin. Investig. Drugs 11(5): 675-685, 2002). La ERT aprovecha la vasculatura para transportar la enzima desde un único sitio de administración a la mayoría de los tejidos. Una vez que la enzima ha sido ampliamente distribuida, las células deben absorberla. La base para que se produzca la absorción en las células se encuentra en una característica exclusiva de las enzimas lisosomales. Las enzimas lisosomales constituyen una clase distinta de glicoproteínas definidas por el fosfato en la posición 6 de los restos de manosa terminales. La manosa-6-fosfato está unida con alta afinidad y especificidad por un receptor que se encuentra en la superficie de la mayoría de las células (Munier-Lehmann *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 24(1): 133-136, 1996; Marnell *et al.*, J. Cell. Biol. 99(6): 1907-1916, 1984). El receptor de manosa-6-fosfato (MPR), que tiene dos sitios de unión a manosa-6-fosfato por cadena de polipéptidos (Tong *et al.*, J. Biol. Chem. 264: 7962-7969, 1989), dirige la absorción de la enzima desde la sangre a los tejidos y después actúa como mediador en el direccionamiento intracelular al lisosoma.

40 La producción a gran escala de enzimas lisosomales implica la expresión en líneas celulares de mamífero. El objetivo es la secreción predominante de enzimas recombinantes en el medio de crecimiento circundante para la recogida y procesamiento aguas abajo. En un sistema ideal para la producción a gran escala de enzimas lisosomales, la enzima debería fosforilarse eficazmente y después dirigirse principalmente hacia la superficie celular (es decir, para la secreción), en lugar de principalmente al lisosoma. Como se ha descrito anteriormente, esta distribución de las enzimas fosforiladas lisosomales es exactamente lo contrario de lo que ocurre en las células normales. La fabricación de líneas celulares utilizadas para la producción de enzimas lisosomales se centra en maximizar el nivel de manosa-6-fosfato por mol de enzima, pero se caracteriza por una productividad específica baja. Intentos realizados *in vitro* para producir enzimas lisosomales que contengan altos niveles de residuos de manosa-6-fosfato han dado como resultado diversos aciertos (Canfiel *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 6.537.785). La enzima presenta *in vitro* altos niveles de manosa-6-fosfato, así como altos niveles de manosa terminal no modificada. La competición entre los receptores de manosa-6-fosfato y los de manosa para la enzima lisosomal da como resultado la necesidad de altas dosis de enzima para su eficacia y puede conducir a una mayor inmunogenicidad en detrimento del sujeto que se está tratando.

55 Las sulfatasas constituyen una subclase exclusiva de enzimas lisosomales. Las sulfatasas escinden ésteres sulfato de diversos sustratos, incluyendo, por ejemplo, esteroides, carbohidratos, proteoglucanos y glucolípidos. Todas las sulfatasas eucariotas conocidas contienen un resto de cisteína en su sitio catalítico. La actividad sulfatasa requiere modificación postraducciona de este resto de cisteína en C_α-formilglicina (FGly). La activación enzimática postraducciona de cisteína a FGly se produce en el retículo endoplasmático en sulfatasas desplegadas inmediatamente después de la traducción, antes de dirigir las sulfatasas al lisosoma (Dierks *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11963-11968, 1997). La enzima generadora de formilglicina que cataliza esta reacción es el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1). La importancia de esta modificación postraducciona exclusiva se pone de manifiesto por el hecho de que las mutaciones en SUMF1, que producen la formación deteriorada de FGly en las enzimas sulfatasas lisosomales, causan Deficiencia Múltiple de Sulfatasa (MSD) en el hombre (Diez-Ruiz *et al.*, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 6:355-379, 2005).

Por consiguiente, la eficacia terapéutica de una preparación de enzima sulfatasa lisosomal depende del nivel de manosa-6-fosfato, y de la presencia de enzima activa en esa preparación.

5 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un sistema eficiente y productivo para la fabricación a gran escala de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, para el tratamiento de trastornos por depósito lisosomal causados por, o asociados a, una deficiencia de dichas enzimas sulfatasas lisosomales.

Sumario de la invención

10 La presente invención se relaciona con el descubrimiento de que cuando se diseña un derivado de la línea celular CHO-K1 (denominada G71) que es defectuosa en la acidificación endosomal para expresar el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano, recombinante, las células G71 modificadas producen altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes altamente fosforiladas, activas, en parte impidiendo la pérdida de material al compartimento lisosomal de la línea celular de fabricación. En una realización, la invención proporciona una línea celular del grupo de complementación END3 que coexpresa el SUMF1 humano recombinante y la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, dando como resultado altos rendimientos de enzima altamente fosforilada, activa. Líneas celulares ejemplares son G71, G71 S y sus derivados, que conservan la propiedad deseada de G71, es decir, la capacidad de producir altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes altamente fosforiladas, activas. Esta aplicación de una línea celular CHO-K1 modificada del grupo de complementación END3 que coexpresa el SUMF1 humano recombinante y una enzima sulfatasa lisosomal recombinante sería especialmente útil para la fabricación de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, para su uso en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal por terapia de reemplazo enzimático (ERT).

25 En el presente documento se enseña un nuevo método de producción de enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes, altamente fosforiladas, activas, o fragmentos, mutantes, variantes o derivados de las mismas, biológicamente activos, en una célula CHO del grupo de complementación END3 o derivada de la misma, en cantidades que permiten su uso terapéutico. Un método que puede comprender las etapas de: (a) cultivar una célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma; (b) preparar un primer vector de expresión de mamífero capaz de expresar la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa o fragmento, mutante, variante o derivado de la misma, biológicamente activo, en la célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma; (c) preparar un segundo vector de expresión de mamífero capaz de expresar el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano recombinante o fragmento, mutante, variante o derivado del mismo, biológicamente activo, en la célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma; (d) transfectar la célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma, con el primer y segundo vectores de expresión; (e) seleccionar y clonar un transfectante de una célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma que exprese la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada, activa, o un fragmento, mutante, variante o derivado de la misma, biológicamente activo; y (f) optimizar un método de proceso de cultivo celular para fabricar la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada o un fragmento, mutante, variante o derivado de la misma, biológicamente activo. La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante puede seleccionarse del grupo que consiste en arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS).

45 El método desvelado en el presente documento puede implicar las etapas de transfectar un ADNc que codifica toda o parte de la enzima sulfatasa lisosomal y un ADNc que codifica todo o parte del SUMF1 humano en una célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma. El primer y segundo vectores de expresión, que son capaces de expresar la codificación de la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa y el SUMF1 humano, respectivamente, pueden transfectarse simultáneamente en la célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma. El primer y segundo vectores de expresión pueden transfectarse en la célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma secuencialmente. Puede utilizarse un ADNc que codifique una enzima sulfatasa lisosomal humana de longitud completa. También puede usarse un ADNc que codifique un fragmento, mutante, variante o derivado de los mismos biológicamente activos. También puede usarse un ADNc que codifique un SUMF1 humano de longitud completa. También puede usarse un ADNc que codifique un fragmento, mutante, variante o derivado de los mismos biológicamente activos. Pueden usarse vectores de expresión múltiples para transferir los ADNc de la enzima sulfatasa lisosomal humana y de SUMF1 humano, simultánea o secuencialmente en el grupo de complementación END3 derivado de CHO o derivado de la misma. Puede usarse un solo vector de expresión para transferir los ADNc de la enzima sulfatasa lisosomal humana y de SUMF1 humano simultáneamente en la célula del grupo de complementación END3 derivado de CHO o derivada de la misma. La célula del grupo de complementación END3 derivado de CHO o derivada de la misma puede ser una línea celular G71, una línea celular G71 S, o una derivada de G71 o G71 S.

65 En el presente documento se enseña un método que puede comprender la producción de una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa, por ejemplo, arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B

(ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), de una línea celular CHO del grupo de complementación END3 o derivada de la misma. En el presente documento se enseña un método que puede comprender la producción de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa a partir de una línea celular CHO de grupo de complementación END3 o derivada de la misma. Una línea celular del grupo de complementación END3 es cualquier línea celular CHO modificada que conserva las propiedades de una línea celular del grupo de complementación END3, tal como acidificación endosomal defectiva. La célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma puede ser una línea celular G71, una línea celular G71 S o una derivada de G71 o G71 S.

En el presente documento se desvela una línea celular de mamífero deficiente en acidificación endosomal caracterizada por su capacidad para producir enzimas sulfatasa lisosomales humanas recombinantes altamente fosforiladas activas en cantidades que permiten el uso terapéutico de la enzima sulfatasa lisosomal. En el presente documento se desvelan líneas celulares del grupo de complementación END3 derivadas de CHO-K1 denominadas G71, G71S o derivadas de las mismas, que pueden producir altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes altamente fosforiladas activas, permitiendo de este modo la producción a gran escala de dichas enzimas sulfatasas lisosomales terapéuticas. La línea celular puede expresar y secretar una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante en cantidades de al menos aproximadamente 0,5, preferentemente de al menos aproximadamente 0,75, más preferentemente de al menos aproximadamente 1,0 e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 1,25 picogramos/célula/día.

Una línea celular de grupo de complementación END3 es cualquier línea celular CHO modificada que conserva las propiedades de una línea celular del grupo de complementación END3, tal como acidificación endosomal defectuosa. La línea celular CHO de grupo de complementación END3 puede derivar de G71 o de un derivado de la misma puede comprender (a) un vector de expresión para el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano recombinante y (b) un vector de expresión para enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, en el que la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante puede seleccionarse del grupo que consiste en arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS). La línea celular CHO del grupo de complementación END3 puede comprender el vector de expresión para la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante. La línea celular CHO del grupo de complementación END3 puede expresar y segregar la GALNS humana recombinante. La línea celular CHO del grupo de complementación END3 puede seleccionarse del grupo que consiste en el clon 4, clon 5, clon C6, clon C2, clon C5, clon C7, clon C10, clon C11 y clon C30. La línea celular CHO del grupo de complementación END3 puede ser el clon C2. La línea celular CHO del grupo de complementación END3 puede adaptarse para el crecimiento en suspensión.

En el presente documento se desvelan enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes producidas de acuerdo con los métodos enseñados en el presente documento y por lo tanto presentes en cantidades que permiten el uso terapéutico de las enzimas sulfatasas lisosomales. Las enzimas sulfatasas lisosomales pueden ser proteínas de longitud completa, o fragmentos, mutantes, variantes o derivados de las mismas. La enzima sulfatasa lisosomal o fragmento, mutante, variante o derivado de la misma, puede modificarse según se desee para potenciar su estabilidad o sus propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, PEGilación, mutagénesis, fusión, conjugación). La enzima puede ser una enzima sulfatasa lisosomal humana, un fragmento de la enzima sulfatasa lisosomal humana que tiene una actividad biológica de una enzima sulfatasa nativa, o un polipéptido que tiene homología de secuencia de aminoácidos sustancial con la enzima sulfatasa lisosomal humana. La enzima sulfatasa lisosomal puede ser una proteína de secuencia humana o de mamífero, de origen o derivación. La enzima sulfatasa lisosomal puede ser tal que su deficiencia cause una enfermedad humana, tal como la Leucodistrofia Metacromática o MLD (es decir, arilsulfatasa A (ARSA)), el síndrome de Maroteaux-Lamy o MPS VI (es decir, arilsulfatasa B (ARSB)), el síndrome de Hunter o MPS II (es decir, iduronato-2-sulfatasa (IDS)), el síndrome de Sanfilippo A o MPS IIIa (es decir, sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH)), el síndrome de Sanfilippo D o MPS IIIc (es decir, N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S)) y el Síndrome de Morquio A o MPS IVa (es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)). La enzima sulfatasa lisosomal puede ser tal que su deficiencia cause el síndrome de Morquio A o MPS IVa (es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)). La enzima sulfatasa lisosomal puede ser tal que su deficiencia esté asociada a una enfermedad humana, tal como una Deficiencia Múltiple de Sulfatasa o MSD (es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)).

La enzima sulfatasa lisosomal puede ser también de origen o de derivación de secuencia humana o mamífero. La secuencia de aminoácidos de la enzima sulfatasa lisosomal puede ser idéntica a la parte correspondiente de una secuencia de aminoácidos de la enzima sulfatasa lisosomal de ser humano o de mamífero. El residuo polipeptídico puede ser la enzima sulfatasa lisosomal nativa del ser humano o del mamífero. El polipéptido de la enzima sulfatasa lisosomal puede ser sustancialmente homólogo (es decir, al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos) en toda la longitud del polipéptido, a la secuencia de aminoácidos de la enzima sulfatasa lisosomal nativa de la enzima de ser humano o de mamífero. La enzima sulfatasa lisosomal puede ser N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana. La secuencia de aminoácidos de la GALNS humana se expone en la SEQ ID NO: 4, cuyos aminoácidos 27 a 522 corresponden a la proteína precursora secretada. La enzima GALNS puede comprender o constar de una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 95 %,

96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, o una secuencia idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4. La enzima GALNS conserva preferentemente los aminoácidos del sitio catalítico correspondientes a la Cys en la posición 53 de la proteína precursora secretada (aminoácido 79 de SEQ ID NO: 4), que tiene la capacidad de convertirse a C_α-formilglicina. La enzima GALNS también puede conservar otros aminoácidos en la cavidad del sitio activo, incluyendo al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 o todos los aminoácidos cargados: Asp288, Asn289, Asp39, Asp54, His236, Lys140, His142, Lys310 y la hélice-α: Arg83. Sukegawa, Human Molecular Genetics, 2000, Vol. 9, n.º 9 1283-1290, describe mutaciones adicionales que disminuyen la actividad de GALNS en pacientes y correlaciona la gravedad de varias mutaciones con su localización tridimensional respectiva dentro de la enzima.

La enzima sulfatasa lisosomal desvelada en el presente documento puede ser una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada producida por una línea celular deficiente en acidificación endosomal, por ejemplo, una línea celular del grupo de complementación END3 derivada de CHO. Una línea celular del grupo de complementación END3 es cualquier línea celular CHO modificada que conserve las propiedades de una línea celular del grupo de complementación END3, tal como acidificación endosomal defectuosa. La célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO desvelada en el presente documento o derivada de la misma puede ser una línea celular G71, una línea celular G71S, o una derivada de G71 o G71S. La enzima sulfatasa lisosomal desvelada en el presente documento puede producirse por cualquier célula hospedadora, por ejemplo, por cualquier línea de célula CHO o derivada de célula CHO, cultivada en condiciones que permitan la expresión y secreción de la enzima sulfatasa lisosomal recombinante altamente fosforilada a un rendimiento relativamente alto, por ejemplo, en cantidades de al menos aproximadamente 0,5, de al menos aproximadamente 0,75, de al menos aproximadamente 1,0 o de al menos aproximadamente 1,25 picogramos/célula/día.

La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante desvelada en el presente documento puede tener un alto nivel de oligosacáridos fosforilados (es decir, mayor de aproximadamente 0,25, preferentemente mayor de 0,5 y más preferentemente mayor de aproximadamente 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína).

En el presente documento se desvela una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, por ejemplo, GALNS, con un alto nivel específico de oligosacáridos fosforilados. Por ejemplo, la enzima sulfatasa lisosomal desvelada en el presente documento puede tener de 0,5 a 1,0 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, o de 0,5 a 0,9 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, o de 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, o de 0,5 a 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica o de 0,54 a 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica. Se contemplan otros intervalos similares, por ejemplo, al menos 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6 o 0,65 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, hasta 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 0,98 o 1,0 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, o mediante cualquier combinación de cualquiera de estos números. La enzima puede ser una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, por ejemplo, de SEQ ID NO: 4.

La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante desvelada en el presente documento puede tener un alto porcentaje (es decir, de al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 % o 65 %, preferentemente de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de conversión del resto de cisteína en el sitio activo en C_α-formilglicina (FGly). En realizaciones preferidas, la enzima es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante activa y el resto de cisteína en el sitio activo es la Cys en la posición 53 (posición 79 de SEQ ID NO: 4).

La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante desvelada en el presente documento puede tener un alto nivel de oligosacáridos fosforilados, por ejemplo, cualquiera de los intervalos o niveles de cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica descritos en el presente documento, junto con un alto porcentaje de conversión del resto de cisteína en el sitio activo en C_α-formilglicina (FGly), por ejemplo, cualquiera de los porcentajes descritos en el presente documento. La enzima desvelada en el presente documento puede ser una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa, por ejemplo, de SEQ ID NO: 4.

En el presente documento se desvela que al menos el 99,5 %, al menos el 99 %, al menos el 98,5 %, al menos el 98 %, al menos el 97 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, o al menos el 65 % de la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, por ejemplo, GALNS (SEQ ID NO: 4), está en forma precursora, determinada por tinción con Azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras o a electroforesis capilar en gel con SDS (SDS-CGE).

Además, la enzima sulfatasa lisosomal, por ejemplo, GALNS (SEQ ID NO: 4), también exhibe opcionalmente una actividad específica que es al menos aproximadamente 30 % (por ejemplo, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces o 50 veces) mayor que la actividad específica de una enzima sulfatasa lisosomal control de la misma secuencia de aminoácidos que se ha producido en células hospedadoras (por ejemplo, células CHO o células derivadas de CHO) que no expresa SUMF1 humano recombinante.

La enzima sulfatasa lisosomal descrita, por ejemplo, GALNS (SEQ ID NO: 4), puede exhibir una absorción específica (Kabsorción) en fibroblastos que es de aproximadamente 0,1 a 10 nM, o de aproximadamente 0,1 a 7 nM, o de aproximadamente 0,5 a 5 nM, o de aproximadamente 1 a 5 nM, o de aproximadamente 1 a 3,5 nM, de aproximadamente 1 nM, de aproximadamente 1,5 nM, de aproximadamente 2 nM, de aproximadamente 2,5 nM, de aproximadamente 3 nM o de aproximadamente 3,5 nM, o cualquier combinación de cualquiera de estos números.

En el presente documento se desvela que al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 % de la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, por ejemplo, GALNS (SEQ ID NO: 4), se une a una columna de receptor de manosa-6-fosfato.

De acuerdo con este aspecto, se proporcionan preparaciones purificadas de la enzima GALNS en las que la enzima GALNS (SEQ ID NO: 4) tiene una pureza de al menos aproximadamente 95 %, 97 %, 98 % o 99 %, determinada por tinción con Azul de Coomassie cuando se somete SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

En algunas realizaciones, una cantidad significativa del componente enzimático GALNS de la preparación purificada está en forma precursora secretada (por ejemplo, al menos 98 %, 98,5 %, 99 % o 99,5 % en forma precursora), determinada por tinción con Azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras o por otro método de detección de precursor (por ejemplo, SDS-PAGE en condiciones reductoras con tinción Azul de Coomassie o plata, o a separación cromatográfica por HPLC (por ejemplo, fase inversa (RP) C4, RP C3) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), o una combinación de separación electroforética y separación cromatográfica, por ejemplo, SDS-PAGE seguida de electroforesis capilar en gel con SDS (SDS-CGE).

En realizaciones particulares, el componente enzimático GALNS de la preparación purificada tiene un alto nivel de oligosacáridos fosforilados, por ejemplo, cualquiera de los intervalos o niveles de cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica descrita en el presente documento, junto con un alto porcentaje de conversión del resto de cisteína en el sitio activo en C_α-formilglicina (FGly), por ejemplo, cualquiera de los porcentajes descritos en el presente documento. En realizaciones más particulares, la preparación purificada tiene una Kabsorción como se describe en el presente documento.

En aspectos relacionados, la invención proporciona composiciones estériles que contienen la enzima GALNS purificada por métodos descritos en el presente documento, junto con un diluyente, transportador y/o excipiente estéril, farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones estériles pueden adoptar la forma de soluciones o polvo liofilizado, opcionalmente en viales, que pueden reconstituirse por la adición de un diluyente estéril.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para purificar enzimas GALNS humanas recombinantes producidas por los métodos enseñados en el presente documento. Las enzimas sulfatasas lisosomales desveladas en el presente documento pueden purificarse usando un proceso en dos columnas (cromatografía de colorante-ligando, por ejemplo, Azul Sefarosa y cromatografía de intercambio de cationes, por ejemplo, SE Hi-Cap) que comprende al menos cinco etapas de purificación: (1) filtrar lo recogido, es decir, el medio de cultivo de una línea celular CHO del grupo de complementación END3 o derivada de la misma que exprese el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante; (2) ajustar el pH de lo recogido filtrado a pH 4,5 (para inducir la precipitación de proteínas contaminantes); (3) cargar lo recogido, filtrado y ajustado de pH, sobre una columna de colorante-ligando, por ejemplo, columna de Azul Sefarosa, lavar la columna y eluir la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; (4) cargar el eluato de la columna de colorante-ligando sobre una columna de intercambio de cationes, por ejemplo, una columna SE Hi-Cap, lavar la columna y eluir la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; y (5) ultrafiltrar y diafiltrar el eluato del intercambio de cationes. Opcionalmente, lo recogido filtrado en la etapa (1) se concentra 10-20 veces por ultrafiltración antes de ajustar el pH. Opcionalmente, la enzima sulfatasa lisosomal ultrafiltrada y diafiltrada en la etapa (5) se formula en un tampón de formulación. En una realización particularmente preferida, la enzima lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante.

Las enzimas sulfatasas lisosomales desveladas en el presente documento pueden purificarse usando un proceso de tres columnas (cromatografía de captura, por ejemplo, SE Hi-Cap de intercambio de cationes; cromatografía intermedia, por ejemplo, Capto Blue de colorante-ligando, Sefarosa FF Quelante con Zinc o Capto Adhere; y cromatografía de pulido, por ejemplo, ToyoPearl Butyl 650M, Fenil Sefarosa Hi-Sub o Fenil Sefarosa Low-Sub) que comprende al menos cinco etapas de purificación: (1) la ultrafiltración de lo recogido, es decir, medio de cultivo de una línea celular CHO del grupo de complementación END3 o derivada de la misma que exprese el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, por ejemplo, mediante Casetes de Sartocoon (30 kDa, Hydrosart); (2) ajustar el pH de lo recogido filtrado a pH 4,5 (para inducir la precipitación de las proteínas contaminantes); (3) cargar lo recogido filtrado y ajustado de pH en una columna de captura, por ejemplo, intercambio de cationes Fractogel EMD SE Hi-CAP (M), lavar la columna y eluir la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; (4) cargar el eluato de la columna de captura sobre una columna intermedia, por ejemplo, Capto Blue de colorante-ligando, Sefarosa FF Quelante con Zinc o Capto Adhere, lavar la columna y eluyendo la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; y (5) cargar el eluato en una columna de pulido, por ejemplo, ToyoPearl Butyl 650M, Fenil Sefarosa Hi-Sub o Fenil Sefarosa Low-Sub, lavar la columna y eluir la enzima sulfatasa lisosomal de la columna. La enzima sulfatasa lisosomal eluída de la etapa (5) se formula en un tampón de

formulación. Opcionalmente, la enzima sulfatasa lisosomal eluída de la etapa (5) se ultrafiltra y después se formula en un tampón de formulación. Opcionalmente, la enzima sulfatasa lisosomal de la columna en la etapa (4) se expone a pH 3,5 para la inactivación de virus a pH bajo antes de cargarla sobre la columna de pulido en la etapa (5). En una realización particularmente preferida, la enzima sulfatasa lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante.

La presente invención proporciona un método de purificación de una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de la SEQ ID NO: 4, en el que dicha enzima GALNS tiene una pureza de al menos 95 % determinada por Tinción con Azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, tiene una conversión de al menos 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, y en el que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora determinada por electroforesis capilar en gel con dodecil sulfato sódico (SDS-CGE), que comprende:

- a) la filtración de un medio de cultivo que contiene la enzima GALNS segregada de una línea celular de mamífero que expresa el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y la enzima GALNS humana recombinante, la ultrafiltración/diafiltración del medio de cultivo filtrado, mediante el cual el medio de cultivo ultrafiltrado/diafiltrado se concentra a aproximadamente 20X, y la filtración en carbón vegetal del medio de cultivo ultrafiltrado/diafiltrado 20 X concentrado;
- b) la carga del medio del cultivo ultrafiltrado/diafiltrado 20X filtrado en carbón vegetal de la etapa a) en una columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn, el lavado de la columna en condiciones tales que la enzima GALNS se retenga en la columna y la elución de la enzima GALNS de la columna;
- c) la filtración del eluato de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn en la etapa b) a través de un filtro para eliminar virus;
- d) el ajuste del pH del eluato del filtrado de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn de la etapa c) a aproximadamente pH 4,5 ± 0,1 y la filtración del eluato del filtrado de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn ajustado a pH 4,5;
- e) la carga del filtrado de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn ajustado a pH 4,5 de la etapa d) en una columna de intercambio de cationes Fractogel EMD SE Hi-Cap, el lavado de la columna en condiciones tales que la enzima GALNS se retenga en la columna, y la elución de la enzima GALNS de la columna;
- f) el ajuste del pH del eluato de la columna de intercambio de cationes Fractogel EMD SE Hi-Cap de la etapa e) a aproximadamente pH 3,5 ± 0,1 para la inactivación de virus;
- g) el ajuste del eluato que ha experimentado inactivación de virus a pH 3,5 de la etapa f) a aproximadamente pH 5,0, después, la carga del eluato que ha experimentado inactivación de virus ajustado a pH 5,0 en una columna de pulido ToyoPearl Butyl 650 M, el lavado de la columna en condiciones tales que la enzima GALNS se retenga en la columna, y la elución de la enzima GALNS de la columna;
- h) el cambio de tampón del eluato de la columna de pulido ToyoPearl Butyl 650 M de la etapa g) en una formulación que comprenda NaOAc/HOAc 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, HCl arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (p/v), pH 5,4 y el ajuste de la concentración de la enzima GALNS en la formulación a aproximadamente 3 mg/ml;
- i) la retirada de cualquier virus y/o ADN residual filtrando la formulación cuyo tampón se ha cambiado en la etapa h) con un filtro DV20 y un filtro Mustang Q; y
- j) la adición de polisorbato 20 (PS20) a la formulación en la etapa i) a una concentración final de 0,01 % (p/v).

En algunas realizaciones, lo recogido se recoge en la etapa (1) a un pH de aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, el filtro de carbón vegetal en la etapa (1) es un filtro de Carbón Zeta Plus R55 activado. En algunas realizaciones, la columna de captura en la etapa (2) es una columna Zn-IMAC en la que la columna Zn-IMAC es una columna de Sefarosa FF quelante con Zn. En algunas realizaciones, el filtro en la etapa (3) es un filtro Mustang Q. En algunas realizaciones, el pH ácido del eluato o eluato filtrado de la etapa (2) o (3) se ajusta en la etapa (4) a aproximadamente 4,5 ± 0,1. En algunas realizaciones, la columna intermedia en la etapa (5) es una columna de intercambio de cationes en la que la columna de intercambio de cationes es una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap. En algunas realizaciones, el pH bajo del eluato de la columna intermedia de la etapa (6) se ajusta en la etapa (6) a aproximadamente 3,5 ± 0,1. En algunas realizaciones, la columna de pulido en la etapa (7) es una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en la que la columna HIC es una columna ToyoPearl Butyl 650M.

En algunas realizaciones, la formulación comprende NaOAc/HOAc 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, HCl arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (p/v), pH 5,4. En algunas realizaciones, el tensioactivo no iónico es polisorbato 20 (PS20). En algunas realizaciones, la concentración de la enzima sulfatasa lisosomal en la formulación se ajusta a aproximadamente 3 mg/ml. En algunas realizaciones, el filtro para virus es un filtro DV20 y el filtro para ADN es un filtro Mustang Q. En algunas realizaciones, el tensioactivo no iónico añadido a la formulación es polisorbato 20 (PS20) a una concentración final de 0,01 % (p/v).

En el presente documento se desvela una preparación purificada de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa o un mutante, variante o derivado de la misma biológicamente activo útil para el tratamiento de un sujeto que padece Mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A. En una realización preferida, la preparación purificada de GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa tiene un componente enzimático GALNS que tiene: (a) una pureza de al menos aproximadamente

95 %, 97 %, 98 % o 99 % determinada por tinción con Azul de Coomassie o plata cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras; (b) al menos aproximadamente una conversión de 80 %, 85 %, 90 % o 95 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly) (posición 79 de SEQ ID NO: 4); (c) glicosilación unida a N en los restos de asparagina en las posiciones 178 y 397, en la que algunas de las cadenas de oligomanosa unidas al resto de asparagina en la posición 178 están bis-fosforiladas; (d) de 0,5 a 0,8, o de 0,5 a 0,75, o de 0,54 a 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica (por ejemplo, al menos 0,5, 0,55, 0,6 o 0,65 y hasta 0,7, 0,75 o 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica o cualquier combinación de estos números); y (e) al menos 98 %, 98,5 %, 99 % o 99,5 % de la enzima GALNS está en forma precursora determinada por tinción con Azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras o por electroforesis capilar en gel con SDS (SDS-CGE). Además, la enzima GALNS también puede opcionalmente (f) exhibir una actividad específica que es al menos aproximadamente 30 % (por ejemplo, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces o 50 veces) mayor que la actividad específica de una enzima GALNS de control de la misma secuencia de aminoácidos que se ha producido en las células hospedadoras (por ejemplo, células CHO o células derivadas de CHO) que no expresan el SUMF1 humano recombinante. Opcionalmente, la enzima GALNS exhibe una absorción específica (Kabsorción) en fibroblastos que es de aproximadamente 0,1 a 10 nM, o de aproximadamente 0,1 a 7 nM, o de aproximadamente 0,5 a 5 nM, o de aproximadamente 1 a 5 nM, o de aproximadamente 1 a 3,5 nM, de aproximadamente 1 nM, de aproximadamente 1,5 nM, de aproximadamente 2 nM, de aproximadamente 2,5 nM, de aproximadamente 3 nM o de aproximadamente 3,5 nM o cualquier combinación de cualquiera de estos números.

La GALNS humana recombinante altamente fosforilada, activa, purificada consta de una banda principal de aproximadamente 55-60 kDa (es decir, siendo la GALNS humana precursora al menos 98 %, al menos 98,5 %, al menos 99 % o al menos 99,5 % de las proteínas visibles) y de bandas minoritarias a ~ 39 kDa y ~ 19 kDa (es decir, siendo la GALNS humana madura o procesada menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 1,5 %, menos de aproximadamente 1 % o menos de aproximadamente 0,5 % de las proteínas visibles) determinada por SDS-CGE. En una realización particularmente preferida, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada altamente, activa, purificada consta esencialmente de una sola banda de aproximadamente 55-60 kDa (es decir, GALNS humana precursora) cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras, o determinada por SDS-CGE. En una realización, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada, activa, purificada es para su uso en tratamiento de MPS IVa o síndrome de Morquio A.

La línea del grupo de complementación END3 derivada de CHO o una derivada de la misma, es una línea celular G71, una línea celular G71 S o una derivada de G71 o de G71 S como se enseña en el presente documento.

En el presente documento también se enseña un método de terapia de reemplazo enzimático, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de enzima sulfatasa lisosomal a un sujeto que necesite la terapia de reemplazo enzimático, en el que las células del paciente tienen lisosomas que contienen cantidades insuficientes de la enzima sulfatasa lisosomal para impedir o reducir daños en las células, mediante lo cual cantidades suficientes de la enzima sulfatasa lisosomal entra en los lisosomas para impedir o reducir daños en las células. Las células pueden estar dentro o fuera del SNC o no es preciso que salgan de la sangre por las paredes capilares cuyas células endoteliales están estrechamente selladas para la difusión de un agente activo por uniones estrechas.

La GALNS humana recombinante altamente fosforilada, activa, purificada por los métodos de la presente invención consta de una banda principal de aproximadamente 55-60 kDa (es decir, siendo la GALNS humana precursora al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 98,5 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 99,5 % de las proteínas visibles) y de bandas minoritarias a ~ 39 kDa y ~ 19 kDa (es decir, siendo la GALN humana madura o procesada menos de 2 %, menos de aproximadamente 1,5 %, menos de aproximadamente 1 % o menos de aproximadamente 0,5 % de las proteínas visibles) determinada por SDS-CGE. En una realización más particularmente preferida, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada, activa, purificada por los métodos de la presente invención consta esencialmente de una sola banda de aproximadamente 55-60 kDa (es decir, la GALNS humana precursora) determinada por SDS-CGE.

En un aspecto se proporciona el uso de cualquier formulación enseñada en el presente documento que comprende una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante purificada en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece Mucopolisacaridosis de tipo IV a (MPS IVa) o síndrome de Morquio A.

En el presente documento se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada, activa como se describe anteriormente en el presente documento y uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica desvelada en el presente documento puede comprender una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada, activa producida por los métodos de la invención y uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para la administración por diversas vías tales como administración intratecal, parenteral, tópica, intranasal por inhalación u oral. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para administración parenteral. Las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento que pueden codificar las

enzimas sulfatasas lisosomales de longitud completa o fragmentos, mutantes, variantes o derivados de las mismas pueden administrarse *in vivo* en células que están afectadas por una deficiencia enzimática lisosomal.

La composición farmacéutica desvelada en el presente documento puede comprender una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada, activa, o un fragmento mutante, variante o derivado de la misma, biológicamente activo, producido por los métodos de la invención y uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables en una formulación que comprende uno o más agentes tampón y uno o más estabilizantes. La composición puede comprender una cantidad de tampón fosfato eficaz para reducir la desfosforilación de dicha enzima GALNS; y una cantidad estabilizante de uno o más estabilizantes seleccionados de un grupo que consiste en sales de aminoácidos, tampones de aminoácidos, tensioactivos y polioles; estando dicha formulación a un pH de aproximadamente 5,0-5,8.

En algunas realizaciones, la enzima GALNS comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y tiene: (i) una pureza de al menos aproximadamente 95 % determinada por tinción con azul de Coomassie, cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, (ii) al menos aproximadamente una conversión del 80 % del resto de cisteína en la posición 53 en C α -formilglicina (FGly), y (iii) entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, en el que al menos el 95 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora, determinada por electroforesis capilar en gel con SDS. En algunas realizaciones, la enzima GALNS tiene al menos aproximadamente un 90 % de conversión del resto de cisteína en la posición 53 a C α -formilglicina (FGly). En algunas realizaciones, entre el 50 % al 80 % de la enzima GALNS se une a una columna de receptor de manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, la enzima GALNS exhibe una absorción (Kabsorción) específica en fibroblastos que es de aproximadamente 1 a 5 nM. En algunas realizaciones, la enzima GALNS exhibe una absorción específica (Kabsorción) en fibroblastos que es de aproximadamente 1 a 3,5 nM.

La concentración de la enzima GALNS en la formulación es de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 5 mg/ml y más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 1,5 mg/ml.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende una cantidad de tampón fosfato eficaz para reducir la desfosforilación de dicha enzima GALNS, en el que el tampón fosfato es NaH₂PO₄. En una realización adicional, la formulación comprende adicionalmente un segundo tampón. En una realización el segundo tampón es un tampón de acetato en el que el tampón de acetato es NaOAc/HOAc. En el apartado *Descripción Detallada* se describen ejemplos de tampones con mayor detalle.

Se contempla que la concentración de NaOAc/HOAc en la formulación es de aproximadamente 10 a 30 mM. En una realización relacionada, la concentración de NaH₂PO₄ en la formulación es de aproximadamente 25 a 75 mM. En determinadas realizaciones, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,0-5,8.

La formulación puede comprender una cantidad estabilizante de uno o más estabilizantes seleccionados del grupo que consiste en sales de aminoácidos, tampones de aminoácidos, tensioactivos y polioles. En una realización, el estabilizante es una sal de arginina o un tampón, opcionalmente clorhidrato de arginina. En una realización relacionada, el estabilizante es un polisorbato, opcionalmente polisorbato 20. El estabilizante puede ser un alcohol de azúcar trihídrico o superior, opcionalmente sorbitol. En el apartado *Descripción Detallada* se describen ejemplos de estabilizante con mayor detalle.

En determinadas realizaciones, los estabilizantes se seleccionan de clorhidrato de arginina o Tween-20 (polisorbato 20), y sorbitol. En algunas realizaciones, la concentración de HCl arginina en la formulación es de aproximadamente 10 a 50 mM. En otra realización, la concentración de Tween-20 es de aproximadamente 0,005 a 0,015 % (p/v). En una realización relacionada, la concentración de sorbitol en la formulación es de aproximadamente 1,0 a 3,0 % (p/v). En una realización, la formulación comprende una sal o tampón de arginina, un polisorbato y un poliol.

La presente invención proporciona una formulación que comprende a) la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante purificada por un método enseñado en el presente documento, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y que tiene una pureza de al menos 95 %, determinada por tinción con azul de Coomassie, cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, que tiene una conversión de al menos 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C α -formilglicina (FGly), y que tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena proteína monomérica, en el que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora determinada por SDS-CGE, y b) uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden: (i) una cantidad de tampón fosfato eficaz para reducir la desfosforilación de dicha enzima GALNS, en el que el tampón fosfato es NaH₂PO₄ a una concentración de aproximadamente 25 mM a 75 mM; y (ii) una cantidad estabilizante de lo siguiente: una sal o tampón de arginina, opcionalmente clorhidrato de arginina, en el que la sal o tampón de arginina está a una concentración de aproximadamente 10 mM a 50 mM; un polisorbato, opcionalmente polisorbato 20; y un alcohol de azúcar trihídrico o superior, opcionalmente sorbitol; en el que dicha formulación está a un pH de aproximadamente 5,0-5,8.

La presente invención proporciona también una formulación que comprende a) una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante purificada por un método enseñado en el presente documento,

comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y que tiene una pureza de al menos 95 %, determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete SDS-PAGE en condiciones no reductoras que tiene una conversión de al menos 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y que tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bisfosforiladas por cadena proteína monomérica, en el que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora, determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras, y b) uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden: (i) NaOAc/HOAc y NaH₂PO₄ como agente tampón, en el que la concentración de NaOAc/HOAc es de aproximadamente 20 +/- 10 mM y la concentración de NaH₂PO₄ es de 50 +/- 25 mM; y (ii) HCl arginina, polisorbato 20 y sorbitol como estabilizantes, en el que la concentración de HCl arginina es de aproximadamente 30 +/- 20 mM, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente 0,01 % +/- 0,005 % (p/v) y la concentración de sorbitol es de aproximadamente 2,0 % +/- 1,0 % (p/v); y (iii) un pH de aproximadamente 5,4 +/- 0,4.

En el presente documento se enseña un método de prevención de la desfosforilación de una enzima GALNS humana recombinante que comprende mezclar la enzima GALNS y un tampón fosfato, a una concentración final de tampón fosfato que está entre aproximadamente 25 mM y 75 mM. La cantidad de desfosforilación puede reducirse en comparación con una formulación de la misma enzima en tampón fosfato 1 mM, por ejemplo, cuando se ensaya después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses, de conservación a temperatura ambiente (por ejemplo a 25 °C).

En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica comprende una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, altamente fosforilada, activa, purificada con los métodos de la invención, y uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, en una formulación que comprende NaOAc/HOAc y NaH₂PO₄ como agentes tampón, y HCl arginina, Tween-20 (polisorbato 20) y sorbitol como estabilizantes. La concentración de GALNS en la formulación es de aproximadamente 1,0 +/- 0,5 mg/ml. La concentración de NaOAc/HOAc en la formulación es de aproximadamente 20 +/- 10 mM, y la concentración de NaH₂PO₄ en la formulación es de aproximadamente 50 +/- 25 mM. El pH de la formulación es de 5,4 +/- 0,4. La concentración de HCl arginina en la formulación es de aproximadamente 30 +/- 20 mM. La concentración de Tween-20 en la formulación es de aproximadamente 0,01 +/- 0,005 % (p/v). La concentración de sorbitol en la formulación es de aproximadamente 2,0 +/- 1,0 % (p/v).

En el presente documento se enseña un método para detectar la actividad de una enzima sulfatasa lisosomal que comprende (a) cultivar células de condrocitos de un paciente que padece deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal, por ejemplo, de un paciente que padece síndrome de Morquio, en condiciones que promuevan el mantenimiento de la diferenciación de los condrocitos; (b) poner en contacto los condrocitos con una enzima sulfatasa lisosomal que degrade queratán sulfato; y (c) detectar los niveles de queratán sulfato en las células, en las que un nivel de queratán sulfato reducido en las células que se han puesto en contacto con la enzima sulfatasa lisosomal en comparación con las células que no se han puesto en contacto con la enzima sulfatasa lisosomal, es indicativo de actividad de enzima sulfatasa lisosomal. La enzima sulfatasa lisosomal puede ser N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS). El cultivo puede realizarse en medios que comprendan factor 1 de crecimiento de insulina (IGF1), factor beta de crecimiento transformante (TGF-β), transferrina, insulina y ácido ascórbico. El queratán sulfato puede detectarse por microscopía confocal, o a través de la unión a un anticuerpo contra queratán sulfato. El método puede realizarse con cualquier enzima sulfatasa lisosomal, incluyendo una enzima humana recombinante o de origen natural, o fragmentos o variantes de la misma, incluyendo variantes que comprendan una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la enzima humana precursora, sin secuencia señal, o a su forma madura.

En el presente documento se desvela un ensayo basado en células para medir la actividad de una enzima lisosomal humana recombinante para degradar sustratos naturales. El método puede comprender (a) cultivar una célula humana aislada deficiente en enzima lisosomal, en condiciones en las que se acumulen los sustratos naturales para la enzima lisosomal; (b) poner en contacto la célula con la enzima lisosomal; (c) causar la lisis de la célula; (d) añadir al lisado celular una enzima que (i) sea específica para los sustratos naturales, y (ii) escinda oligosacáridos pequeños de los sustratos naturales; (e) marcar los oligosacáridos pequeños con un residuo detectable; (f) opcionalmente separar los oligosacáridos pequeños marcados; y (h) determinar la actividad de la enzima lisosomal para degradar los sustratos naturales comparando (i) la cantidad de oligosacáridos pequeños marcados de células que se han puesto en contacto con la enzima lisosomal con (ii) la cantidad de oligosacáridos pequeños marcados de células que no se han puesto en contacto con la enzima lisosomal, en el que la reducción en (h)(i) en comparación con (h)(ii) indica la actividad de la enzima lisosomal para degradar sustratos naturales. El oligosacárido pequeño puede ser un mono-, di, o tri-sacárido. El oligosacárido pequeño puede ser un disacárido.

Las células humanas adecuadas que pueden usarse en el ensayo basado en células, incluyen cualquier célula humana que sea deficiente en la enzima lisosomal que se va someter a ensayo, de tal manera que pueda acumular los sustratos naturales para la enzima lisosomal. Por ejemplo, células que exhiban de manera natural una deficiencia completa (100 %) o parcial en cuanto a actividad, por ejemplo, puede usarse una reducción del 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más en cuanto a actividad. Pueden usarse células que expresen una enzima mutante con actividad disminuida, o células procedentes de pacientes que padecen una enfermedad por depósito lisosomal, por

ejemplo, una mucopolisacaridosis. Pueden usarse células alteradas de manera recombinante para desactivar (*knockout*) o reducir la actividad enzimática lisosomal, por ejemplo, introduciendo una mutación en el gen codificante o en su promotor o en otra región reguladora. Pueden usarse células tratadas para reducir la actividad enzimática lisosomal, por ejemplo, tratadas con ARN antisentido o ARNi para reducir la expresión enzimática.

Los expertos habituales en la técnica pueden seleccionar enzimas adecuadas que escindan (digieran) oligosacáridos pequeños de hidratos de carbono y que sean "específicas para" (es decir, digieran predominantemente) los sustratos naturales de la enzima lisosomal. Por ejemplo, para la detección de la actividad de GALNS o GLB1 (enzimas que degradan queratán sulfato) la enzima de la etapa (d) puede ser queratanasa II o cualquier enzima que actúe principalmente sobre queratán sulfato. Como otro ejemplo, para la detección de IDU, ARSB, IDS o GUSB (enzimas que degradan dermatán sulfato), la enzima de la etapa (d) puede ser condroitinasa ABC o cualquier enzima que actúe principalmente sobre dermatán sulfato. Como otro ejemplo, para la detección de IDU, IDS, SGHS, G6S o GUSB (enzimas que degradan heparán sulfato), la enzima de la etapa (d) puede ser heparanasa I o heparanasa II, o ambas. Como otro ejemplo más, para la detección de GAA (una enzima que degrada glicógeno), la enzima de la etapa (d) puede ser α -amilasa o cualquier enzima que actúe principalmente sobre glicógeno.

Este método basado en células puede tener una gran sensibilidad en la detección de actividad enzimática lisosomal. En algunas realizaciones, la actividad enzimática lisosomal puede ser detectable cuando la concentración de la enzima lisosomal es tan solo de aproximadamente 10 nM, o de aproximadamente 5 nM, o de aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 0,75 nM, o de aproximadamente 0,5 nM, o de aproximadamente 0,25 nM, o de aproximadamente 0,1 nM, o de aproximadamente 0,05 nM, o de aproximadamente 0,01 nM, o de aproximadamente 0,005 nM, o de aproximadamente 1 pM, o de aproximadamente 0,5 pM.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 describe la secuencia de nucleótidos del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 describe la secuencia de aminoácidos del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano (SEQ ID NO: 2).

La Figura 3 describe la secuencia de nucleótidos de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana (SEQ ID NO: 3).

La Figura 4 describe la secuencia de aminoácidos de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana (SEQ ID NO: 4). En la GALNS procesada, el péptido señal de 26 aminoácidos del extremo N no está presente.

La Figura 5 representa la estructura y las características de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana procesada (SEQ ID NO: 5).

La Figura 6 muestra la expresión de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana de células G71S transfectadas conjuntamente con el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y con vectores de expresión de GALNS humana. (A) Exploración del Clon G71S para GALNS activa en 96 pocillos. (B) Productividad de GALNS del Clon G71S en picogramos por célula por día.

La Figura 7 ilustra un esquema del controlador del biorreactor WAVE utilizado para la producción a gran escala de células G71 S que expresan la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana y variantes de la misma.

La Figura 8 muestra la estabilidad de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada después de conservación a 4 °C (rombos) o a -70 °C (triángulos).

La Figura 9 muestra la purificación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana por (A) cromatografía con azul sefarosa 6 de flujo rápido (FF, *Fast Flow*) seguida de (B) cromatografía Fractogel SE Hi-CAP. La pureza se determina mediante tinción con azul de Coomassie de SDS-PAGE (a la izquierda) y mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-GALNS (IVA) (a la derecha).

La Figura 10 muestra la purificación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), cromatografía Fractogel SE Hi-Cap, cromatografía con Sefarosa FF quelante con Zn y cromatografía ToyoPearl Butyl 650M. La pureza se determina mediante tinción con azul de Coomassie de SDS-PAGE (parte izquierda superior) y mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-GALNS (parte derecha superior), un anticuerpo anti-catepsina L (parte izquierda inferior) y un anti-CHOP (proteínas de células de ovario de hámster chino (parte derecha inferior)).

La Figura 11 muestra los diagramas de flujo del proceso de la recuperación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana y del proceso de purificación usado para el proceso en fase I/II (a la izquierda) y el

proceso en fase III (a la derecha).

La Figura 12 muestra la comparación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada de acuerdo con el proceso en fase I/II (carril 3) o el proceso en fase III (carril 5). Se separaron 5 microgramos (5 µg) de GALNS purificada por SDS-PAGE en condiciones reductoras, y el gel se tiñó con azul de Coomassie. El carril 1 corresponde a 15 µl de marcador SeeBlue Plus2. Los pesos moleculares en kDa se indican a la izquierda del gel teñido.

La Figura 13 muestra una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato de dermatán sulfato observada en células GM01391 tratadas con IDU.

La Figura 14 muestra una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato de dermatán sulfato observada en células GM00519 tratadas con ARSB.

La Figura 15 muestra la absorción de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, no marcada (círculos) o conjugada con A488 (cuadrados) o con A555 (triángulos), por sinoviocitos cultivados.

La Figura 16 muestra la estabilidad de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada después de su conservación durante 1 o 2 meses a 5 °C, a 25 °C o a 40 °C, según se indica en una formulación que comprende HCl arginina (clorhidrato de arginina) 15 mM, HCl arginina 30 mM, NaCl 15 mM o NaCl 30 mM (paneles indicados como 51, 52, 54 o 55, respectivamente) a pH 5,0, pH 5,4 o pH 5,8 (paneles indicados como A, B o C, respectivamente). La estabilidad se midió por el porcentaje (%) de área pico de agregados de GALNS en la formulación después de su conservación, determinada por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento – cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC).

La Figura 17 muestra la estabilidad de la actividad de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada después de conservación durante 2 meses a 5 °C, a 25 °C o a 40 °C, como se indica en una formulación que comprende HCl arginina 15 mM, HCl arginina 30 mM, NaCl 15 mM o NaCl 30 mM (paneles indicados como 51, 52, 54 o 55, respectivamente) a pH 5,0, pH 5,4 o pH 5,8 (paneles indicados como A, B o C, respectivamente).

La Figura 18 muestra el perfil de glicosilación de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada después de conservación durante 2 meses a 5 °C, a 25 °C o a 40 °C, según se indica en una formulación que comprende HCl arginina 15 mM, HCl arginina 30 mM, NaCl 15 mM o NaCl 30 mM, a pH 5,0, pH 5,4 o pH 5,8, como se indica. El porcentaje de manosa 7 bis-fosforilada (BPM7) se midió mediante electroforesis capilar (CE) después de la digestión de la enzima GALNS con PNGasa F para escindir los oligosacáridos ligados a N de la asparagina. La referencia indica el porcentaje de BPM7 para un lote de referencia de GALNS conservado durante 2 meses a 5 °C, a 25 °C o a 40 °C, como se indica en una formulación que comprende tampón fosfato 100 mM.

La Figura 19 muestra la estabilidad de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada después de conservación durante 2 meses a 5 °C, a 25 °C o a 40 °C, como se indica en una formulación que comprende HCl arginina 15 mM, HCl arginina 30 mM, NaCl 15 mM o NaCl 30 mM (paneles indicados como 51, 52, 54 o 55, respectivamente) a pH 5,0, pH 5,4 o pH 5,8 (paneles indicados como A, B o C, respectivamente). La estabilidad de la enzima GALNS se midió como porcentaje (%) de área pico de enzima GALNS en la formulación después de conservación, determinado por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de un método que reconcilia la necesidad de fabricar a gran escala enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes con la necesidad de obtener un producto de enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada, activa, que sea eficaz en lisosomas diana y que sea por tanto terapéuticamente eficaz.

La eficacia terapéutica de una preparación enzimática lisosomal depende del nivel de manosa-6-fosfato en esa preparación. El fosfato se añade a la glicoproteína diana mediante una modificación postraduccional en el retículo endoplasmático y Golgi precoz. Las enzimas lisosomales plegadas presentan un determinante terciario único que reconoce una enzima de modificación de oligosacáridos. El determinante está compuesto por un conjunto de lisinas específicamente separadas y que se encuentra en la mayoría de las enzimas lisosomales a pesar de la ausencia de homología de secuencia primaria. La enzima de modificación, la UDP-GlcNAc fosfotransferasa, se une al determinante de la proteína y añade GlcNAc-1-fosfato en la posición 6 de restos de manosa terminales en oligosacáridos próximos al sitio de unión; una segunda enzima, la fosfodiéster α-GlcNAcasa, escinde después el enlace GlcNAc-fosfato para dar un oligosacárido de manosa-6-fosfato terminal (Canfield *et al.*, patente de Estados Unidos N.º. 6.537.785). La finalidad de la modificación de manosa -6-fosfato es desviar enzimas lisosomales de la ruta secretora a la ruta lisosomal dentro de la célula. La enzima portadora de manosa-6-fosfato está unida mediante

el MPR en la red trans Golgi y direccionada al lisosoma en lugar de a la superficie celular.

Además de la presencia del marcador manosa-6-fosfato en oligosacáridos enzimáticos lisosomales, el direccionamiento lisosomal de enzimas depende de la acidificación de endosomas en tránsito que emergen desde el extremo del aparato trans Golgi. La inactivación química del entorno ácido dentro de estos endosomas con moléculas básicas difusibles produce la expulsión de contenido vesicular, incluyendo enzimas lisosomales, al medio extracelular (Braulke *et al.*, Eur. J. Cell Biol. 43(3): 316-321, 1987). La acidificación requiere una ATPasa vacuolar específica embebida en la membrana del endosoma (Nishi *et al.*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3(2): 94-103, 2002). Se espera que la insuficiencia de esta ATPasa potencie la secreción de enzimas lisosomales a expensas del direccionamiento lisosomal. Se espera que la fabricación de líneas celulares, portadoras de defectos en la ATPasa vacuolar, impida la desviación no productiva de la enzima recombinante fosforilada al compartimento lisosomal intracelular.

En 1984, se generaron y caracterizaron mutantes de células de ovario de hámster chino (CHO) específicamente defectuosas en acidificación endosomal (Park *et al.*, Somat. Cell Mol. Genet. 17(2): 137-150, 1991). Las células CHO-K1 se mutagenizaron químicamente y seleccionaron para su supervivencia a temperaturas elevadas en presencia de toxinas. Estas toxinas requieren acidificación endosomal para la expresión completa de su letalidad (Marnell *et al.*, J. Cell. Biol. 99(6): 1907-1916, 1984). En el estudio anterior, se eligió un cóctel de dos toxinas con diferentes mecanismos de acción para impedir la selección de resistencia específica de toxina. El principio es que aunque la probabilidad de mutaciones fortuitas que producen resistencia a una toxina particular es pequeña, la probabilidad de dos mutaciones fortuitas simultáneas específicas para dos toxinas totalmente diferentes no existe. Se realizaron selecciones a temperatura elevada para permitir mutaciones sensibles a temperatura. Esta exploración genética produjo dos mutantes, uno de ellos se denominó G.7.1 (G71), que eran resistentes a toxinas a temperaturas elevadas. La lesión producida en G71 no se debía a la absorción o mecanismo de acción de las dos toxinas, sino que resultaba de una incapacidad del clon de acidificar endosomas a temperaturas elevadas. Esta incapacidad también fue evidente a temperaturas permisivas (34 °C), aunque a un menor grado. Se descubrió también que las células G71 eran auxótrofas para hierro a temperaturas elevadas, a pesar de la absorción normal de transferrina del medio (Timchak *et al.*, J. Biol. Chem. 261(30): 14154-14159, 1986). Dado que el hierro se liberaba de la transferrina solamente a un pH bajo, la auxotrofia para hierro a pesar de la captación de transferrina normal indicaba una insuficiencia en la acidificación endosomal. Otro estudio demostró que el defecto de acidificación se manifestaba principalmente en endosomas en lugar de en lisosomas (Stone *et al.*, J. Biol. Chem. 262(20): 9883-9886, 1987). Los datos sobre G71 eran coherentes con la conclusión de que una mutación producía la desestabilización de la ATPasa vacuolar responsable de la acidificación endosomal. La desestabilización fue más evidente a temperaturas elevadas (39,5 °C) pero se expresó parcialmente incluso a temperaturas más bajas (34 °C). Un estudio sobre el tránsito de dos enzimas lisosomales endógenas, la catepsina D y la alfa-glucosidasa, en células G71 (Park *et al.*, Somat. Cell Mol. Genet. 17(2): 137-150, 1991) mostró que ambas enzimas se segregaban cuantitativamente a temperaturas elevadas, y que la glicosilación de las enzimas no estaba afectada. La secreción de la alfa glucosidasa ácida fosforilada aumentó significativamente a temperaturas no permisivas.

La eficacia terapéutica de una preparación de enzima sulfatasa lisosomal no solo depende del nivel de manosa-6-fosfato, sino también depende de la presencia de la enzima activa en esa preparación. Todas las sulfatasas conocidas contienen un resto de cisteína en su sitio catalítico; este resto de cisteína se modifica postraduccionalmente a C_α-formilglicina (FGly) para activar la enzima. Esta activación enzimática postraduccional de la cisteína a FGly, que está catalizada por el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1), se produce dentro del retículo endoplasmático en sulfatasas no plegadas inmediatamente después de la traducción, antes del direccionamiento de las sulfatasas al lisosoma (Dierks *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11963-11968, 1997). La importancia de esta modificación postraduccional única es destacable por el hecho de que las mutaciones en SUMF1, que producen formación de FGly deteriorada en enzimas sulfatasas lisosomales, causa Deficiencia Múltiple de Sulfatasa (DSM) en el hombre (Diez-Ruiz *et al.*, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 6:355-379, 2005).

Por tanto, la capacidad de las células G71, células CHO mutantes que son defectuosas en acidificación endosomal, para coexpresar la enzima de modificación de sulfatasas (SUMF1) humana recombinante y una enzima sulfatasa lisosomal humana, proporciona un mecanismo para la producción a gran escala de enzimas sulfatasas lisosomales humanas, recombinantes, altamente fosforiladas, activas, útiles para el tratamiento de trastornos por depósito lisosomal, causados por o asociados a una deficiencia de dichas enzimas sulfatasas lisosomales.

I. DEFINICIONES

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto una definición general de muchos términos utilizados en la presente invención: Singleton *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

En el presente documento se observa que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno”, “una”, “el”, “la” y “lo”, incluyen referencias en plural a menos que el contexto dictamine claramente otra cosa.

5 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a los mismos a menos que se especifique de otra manera.

10 “Variante alélica” se refiere a cualquiera de dos o más formas polimórficas de un gen que ocupa el mismo locus genético. Las variaciones alélicas surgen de manera natural a través de mutaciones, y pueden dar lugar a polimorfismo fenotípico en las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (es decir, sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. Las “variantes alélicas” también se refieren a ADNc procedentes de transcritos de ARNm de variantes alélicas genéticas, así como las proteínas codificadas por estos.

15 “Amplificación” se refiere a cualquier medio mediante el cual se copia una secuencia de polinucleótidos y por tanto se expande en un número más grande de moléculas de polinucleótidos, por ejemplo, por transcripción inversa, reacción en cadena de polimerasa y reacción en cadena de ligasa.

20 Una primera secuencia es una “secuencia antisentido” con respecto a una segunda secuencia, si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia, se hibrida específicamente con un polinucleótido cuya secuencia es la segunda secuencia.

“ADNc” se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, en forma mono o bicatenaria.

25 En el presente documento para describir las secuencias polinucleotídicas se usa la anotación convencional: el extremo a la izquierda de una secuencia de polinucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección a la izquierda de una secuencia de polinucleótidos bicatenaria se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de nucleótidos de 5' a 3' a transcritos de ARN naciente se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que la de un ARNm se denomina “cadena codificante”; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que la de un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que se localizan en 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan “secuencias aguas arriba”; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que la del ARN y que se localizan en 3' al extremo 3' del transcrito de ARN codificante se denominan “secuencias aguas abajo”.

35 “Complementariedad” se refiere a la compatibilidad topológica o emparejamiento entre sí de superficies de interacción de dos polinucleótidos. Por tanto, las dos moléculas pueden describirse como complementarias, y además, las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí. Un primer polinucleótido es complementario a un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que es idéntica a la secuencia de polinucleótidos del compañero de unión polinucleotídico del segundo polinucleótido. Por tanto, el polinucleótido cuya secuencia 5'-TATAC-3' es complementaria a un polinucleótido cuya secuencia es 5'-GTATA-3'. Una secuencia de nucleótidos es “sustancialmente complementaria” a una secuencia de nucleótidos de referencia si la complementariedad de secuencia con la secuencia de nucleótidos sujeto es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia.

45 “Sustitución conservativa” se refiere a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido con un aminoácido funcionalmente similar. Cada uno de los seis grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 50 1) Alanina (A), serina (S), treonina (T);
 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
 3) Asparagina (N), glutamina (Q);
 4) Arginina (R), lisina (K);
 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y
 55 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

60 El término “fragmento”, cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a polipéptidos que son más cortos que el polipéptido de longitud completa debido al truncamiento en cualquiera del extremo N o extremo C de la proteína o en ambos, y/o a la delección de una región o parte interna de la proteína. Los fragmentos de un polipéptido pueden generarse por métodos conocidos en la técnica.

65 El término “mutante”, cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a polipéptidos en los que se han sustituido uno o más aminoácidos de la proteína por un aminoácido diferente. La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa, como se ha definido anteriormente, o puede ser una sustitución no conservativa. Pueden generarse polipéptidos mutantes por métodos conocidos en la técnica.

El término “derivado”, cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a polipéptidos químicamente modificados por técnicas tales como, por ejemplo y sin limitación, ubiquitinación, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente de polímeros, tal como pegilación (es decir, derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos, tales como ornitina, que normalmente no se produce en las proteínas humanas. Los polipéptidos derivados pueden generarse por métodos conocidos en la técnica.

El término “derivado”, cuando se usa en referencia a líneas celulares, se refiere a líneas celulares que son descendientes de la línea celular parental; por ejemplo, este término incluye células que han experimentado pases o que se han subclonado de células parentales y conservan las propiedades deseadas, descendientes de la línea celular parental que se han mutado y seleccionado para conservar las propiedades deseadas y descendientes de la línea celular parental que se han alterado para que contengan diferentes vectores de expresión o diferentes ácidos nucleicos añadidos de manera exógena.

“Detección” se refiere a la determinación de la presencia, ausencia, o cantidad de un analito en una muestra, y puede incluir la cuantificación de la cantidad del analito en una muestra o por célula en una muestra.

“Residuo detectable” o un “marcador” se refieren a una composición detectable por medio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, inmunoquímico o químico. Por ejemplo, como marcadores útiles se incluyen ³²P, ³⁵S, colorantes fluorescentes, reactivos denso electrónicos, enzimas (por ejemplo, como se usa habitualmente en un ensayo ELISA), biotina-estreptavidina, digoxigenina, haptenos y proteínas para los cuales se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. El residuo detectable a menudo genera una señal medible, tal como una señal radioactiva, cromogénica o fluorescente, que puede usarse para cuantificar la cantidad de residuo detectable unido en una muestra. El residuo detectable puede incorporarse en, o unirse a, un cebador o una sonda de manera covalente, o a través de enlaces iónicos, van der Waals o hidrógeno, por ejemplo, incorporación de nucleótidos radioactivos, o nucleótidos biotinilados que reconocen la estreptavidina. El residuo detectable puede detectarse directa o indirectamente. La detección indirecta puede implicar la unión de un segundo residuo directa o indirectamente detectable con un residuo detectable. Por ejemplo, el residuo detectable puede ser el ligando de un compañero de unión, tal como biotina, que es un compañero de unión de la estreptavidina, o una secuencia de nucleótidos, que es el compañero de unión de una secuencia complementaria, con la que puede hibridarse específicamente. El propio compañero de unión puede ser directamente detectable, por ejemplo, un anticuerpo puede en sí mismo marcarse con una molécula fluorescente. El compañero de unión también puede ser detectable indirectamente, por ejemplo, un ácido nucleico que tenga una secuencia de nucleótidos complementaria puede ser parte de una molécula de ADN ramificada que a su vez sea detectable a través de hibridación con otras moléculas de ácido nucleico marcadas. (Véase, por ejemplo Fahrlander *et al.*, *Bio/Technology* 6: 1165, 1988). La cuantificación de la señal se realiza, por ejemplo, mediante recuento por centelleo, densitometría o citometría de flujo.

“Diagnóstico” significa identificar la presencia o la naturaleza de una patología. Los métodos diagnósticos difieren en su especificidad y selectividad. Aunque un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, basta con que el método proporcione una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

La expresión “cantidad eficaz” significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado en un estado de salud, patología y enfermedad de un sujeto o para fines de diagnóstico. El resultado deseado puede comprender una mejora subjetiva u objetiva en el receptor de la dosificación. “Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a esa cantidad de un agente, que es efectiva para producir el efecto beneficioso que se espera sobre la salud.

“Codificación” se refiere a la propiedad intrínseca de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, que sirven como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm producido por ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y que se proporciona habitualmente en los listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc, pueden referirse como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique de otra manera, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifica la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

“Dosis equivalente” se refiere a una dosis que contiene la misma cantidad de agente activo.

“Secuencia de control de expresión” se refiere a una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido que regula la expresión (transcripción y/o traducción) de una secuencia de nucleótidos unida operativamente a la misma. “Unido(a) operativamente” se refiere a una relación funcional entre dos partes, en la que la actividad de una parte (por ejemplo, la capacidad de regular la transcripción) produce una acción sobre la otra parte (por ejemplo,

transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de expresión pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, secuencias de promotores (por ejemplo inducibles o constitutivas), potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (por ejemplo, ATG), señales de corte y empalme para intrones y codones de terminación.

5 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que va a expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; pueden proporcionarse otros elementos para la expresión por la célula hospedadora o sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

15 "Altamente fosforiladas", "alto nivel de fosforilación" y "alto nivel de oligosacáridos fosforilados" se refiere a preparaciones de enzimas sulfatasas lisosomales en las que al menos el 50 % de la enzima sulfatasa lisosomal se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes a través de oligosacáridos fosforilados. Adicionalmente la unión se caracteriza por sensibilidad frente a la competición con la manosa-6-fosfato. Una enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada también puede referirse a una enzima sulfatasa lisosomal con al menos 0,25, preferentemente al menos 0,5 y más preferentemente al menos 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína. Como alternativa, una enzima sulfatasa lisosomal (GALNS) altamente fosforilada puede referirse a una enzima en la que la absorción específica, K_absorción (la concentración de enzima/ligando que produce la mitad del valor de absorción máximo) en fibroblastos es de aproximadamente 0,1 a 10 nM, o de aproximadamente 0,1 a 7 nM, o de aproximadamente 0,5 a 5 nM, o de aproximadamente 1 a 5 nM, o de aproximadamente 1 a 3,5 nM, o de aproximadamente 1 nM, de aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 3 nM o aproximadamente 3,5 nM o cualquier combinación de cualquiera de estos números.

25 "Cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas", como se usa en el presente documento, se refiere a cadenas de oligosacárido que contienen manosa que están ligadas a N con restos de asparagina en las enzimas sulfatasas lisosomales y comprenden dos restos de manosa-6-fosfato. Generalmente, las cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas tienen 7 restos de manosa, es decir, manosa 7 bis-fosfato (BPM7), que están ligados a dos restos de GlcNAc, que a su vez están ligados al resto de asparagina en la enzima sulfatasa lisosomal.

35 "Activa(s)," "activada(s)" y "alto nivel de activación" se refiere a preparaciones de enzimas sulfatasas lisosomales en las que al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 % preferentemente al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % del resto de cisteína en el sitio activo de la proteína se ha modificado postraduccionalmente para dar C_α-formilglicina (FGly). Como alternativa, "activa(s)," "activada(s)" y "alto nivel de activación" se refiere a preparaciones de enzimas sulfatasas lisosomales que exhiben una actividad específica que es al menos aproximadamente 30 % (por ejemplo, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 2-veces, 2,5-veces, 3-veces, 4 veces, 5-veces, 10-veces, 15-veces, 20-veces, 30-veces, 40-veces o 50-veces) mayor que la actividad específica de una enzima sulfatasa lisosomal de control de la misma secuencia de aminoácidos que se ha producido en células hospedadoras (por ejemplo, células CHO o células derivadas de CHO) que no expresan el SUMF1 humano recombinante. Preferentemente, una preparación de control adecuada de la enzima sulfatasa lisosomal que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la preparación altamente activa, y se expresa a través del mismo gen, usando la(s) misma(s) secuencia(s) promotora(s) o reguladora(s) en la misma célula hospedadora, excepto que la célula hospedadora no expresa el SUMF1 humano recombinante, se produce en las mismas condiciones de cultivo o similares incluyendo el mismo periodo de tiempo de cultivo y opcionalmente se purifica al mismo grado o a un grado similar que la preparación altamente activa.

50 "Altamente fosforiladas, activas" se refiere a preparaciones de enzimas sulfatasas lisosomales en las que al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 90 %, e incluso más preferentemente al menos el 95 % del resto de cisteína en el sitio activo de la proteína se ha modificado postraduccionalmente para dar C_α-formilglicina (FGly) y con al menos 0,25, preferentemente al menos 0,5 y más preferentemente al menos 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína.

55 La expresión "biológicamente activo(a)" se refiere a fragmentos polipeptídicos (es decir, enzima), a mutantes, variantes o derivados de los mismos que conservan al menos una cantidad sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %) de una o más actividades biológicas del polipéptido de longitud completa. Cuando se usa en referencia a una enzima sulfatasa lisosomal, un fragmento mutante, variante o derivado del mismo biológicamente activo conserva al menos una cantidad sustancial de actividad sulfatasa (por ejemplo, escinde ésteres de sulfato de sus sustratos diana). Cuando se usa en referencia al factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1), un fragmento, mutante, variante o derivado de los mismos biológicamente activo conserva al menos una cantidad sustancial de actividad generadora de formilglicina (es decir, modificación de un resto de cisteína en el sitio activo de la enzima sulfatasa lisosomal para dar C_α-formilglicina (FGly)).

65 El término "pureza" o "puro" cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a la cantidad del polipéptido que se analiza en comparación con cualquiera de las sustancias contaminantes que pueden detectarse usando un

método particular. Para las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes de la invención, la "pureza" puede determinarse sometiendo la preparación de la enzima sulfatasa a separación electroforética mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie o plata, o por separación cromatográfica mediante HPLC (por ejemplo, fase inversa (FI) C4, FI C3) o mediante cualquier otra separación cromatográfica, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y similar. Usando cualquiera de estos métodos, las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes purificadas de la invención tienen una pureza de al menos aproximadamente 80 %, o de al menos aproximadamente 85 %, preferentemente de al menos aproximadamente 90 %, más preferentemente de al menos aproximadamente 95 %, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 97 %, 98 % o 99 %.

El término "precursora" o la expresión "forma precursora" se refieren a la forma de la enzima sulfatasa lisosomal recombinante que segrega una célula de mamífero, es decir, que carece de la secuencia señal, aunque carece de determinadas modificaciones, por ejemplo, escisión interna de las proteínas, que normalmente se produce en el lisosoma. El término "madura", la expresión "forma madura", "procesada" o "forma procesada" se refiere a la forma de la enzima sulfatasa lisosomal recombinante que normalmente existe en el lisosoma. Para las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes de la invención, la abundancia relativa de "precursor" o "forma precursora" y "madura", "forma madura", "procesada" o "forma procesada" puede determinarse sometiendo la preparación de la enzima sulfatasa a una separación electroforética mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie o plata, o por separación cromatográfica mediante HPLC (por ejemplo, fase inversa (FI) C4, FI C3) o mediante cualquier otra separación cromatográfica como por ejemplo, exclusión por tamaño (SEC) y similares, o una combinación de separación electroforética y separación cromatográfica, por ejemplo, SDS-PAGE seguido de electroforesis capilar en gel (SDS-CGE). Usando estos métodos, las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes purificadas de la invención constan de al menos aproximadamente 65 %, 70 %, o 75 %, preferentemente de al menos aproximadamente 80 % u 85 %, más preferentemente de al menos aproximadamente 90 %, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 95 %, 97 %, 98 %, 98,5 %, 99 % o 99,5 % de "precursor" o "forma precursora." Como alternativa, usando estos métodos, las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes purificadas de la invención constan de menos de aproximadamente 35 %, 30 % o 25 %, preferentemente de menos de aproximadamente 20 % o 15 %, preferentemente de menos de aproximadamente 10 %, e incluso más preferentemente de menos de aproximadamente 5 %, 3 %, 2 %, 1,5 %, 1 % o 0,5 % de "madura," "forma madura," "procesada" o "forma procesada." En algunas realizaciones, solo se detecta el "precursor" o la "forma precursora" (es decir, la preparación de la enzima sulfatasa consta esencialmente de una sola banda detectable cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras, o como se determina mediante SDS-CGE, o de un solo pico cuando se analiza mediante HPLC.

El término "idénticas" o la expresión porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o de restos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para obtener una correspondencia máxima, que se mide usando los algoritmos de comparación de secuencias indicados más adelante o mediante inspección visual.

"Enlazador" se refiere a una molécula que une otras dos moléculas, de manera covalente o a través de enlaces iónicos, van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia complementaria en el extremo 5' y con otra secuencia complementaria en el extremo 3', uniendo de este modo dos secuencias no complementarias.

"Bajo nivel de fosforilación" o "baja fosforilación" se refiere a una preparación de enzimas sulfatasas lisosomales en las que la absorción en células de fibroblasto tiene una concentración máxima media de más de 10 nM o la fracción de enzimas sulfatasas lisosomales que se unen a la columna de receptor de manosa-6-fosfato es menor de aproximadamente 25 %.

"De origen natural", como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo una secuencia de polipéptidos o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio, es de origen natural.

"Composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para su uso farmacéutico en un sujeto animal incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de una enzima sulfatasa lisosomal terapéutica y también comprende uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica abarca una composición que comprende uno o más principios activos, y uno o más principios inertes que constituyen el transportador, diluyente o excipiente, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de cualquiera de dos o más de los principios, o de la disociación de uno o más de los principios, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los principios. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición fabricada mezclando una enzima sulfatasa lisosomal de la presente invención y uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

“Transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquiera de los transportadores, diluyentes, tampones y excipientes farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo, y sin limitación, una solución salina tamponada con fosfato, una solución acuosa de dextrosa al 5 % y emulsiones, tal como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995), se describen transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticos adecuados y formulaciones. Los transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticos preferidos dependen del modo de administración que se desee del agente activo. Los modos de administración típicos incluyen, por ejemplo y sin limitación, inyección enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal); o administración tópica, transdérmica o transmucosa.

Una “sal farmacéuticamente aceptable” es una sal que puede formularse en una enzima sulfatasa lisosomal para su uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales metálicas (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

“Polinucleótido” se refiere a un polímero compuesto de unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, tales como ácido desoxirribonucleico (“ADN”) y ácido ribonucleico (“ARN”) así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos que incluyen bases de origen no natural, nucleótidos que se acoplan en enlaces con otros nucleótidos distintos del enlace fosfodiéster de origen natural o que incluyen bases unidas a través de ligamientos distintos de enlaces fosfodiéster. Por tanto, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptidonucleicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático. La expresión “ácido nucleico” se refiere generalmente a polinucleótidos grandes. El término “oligonucleótido” se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente no más largos de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos se representa mediante una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que “U” reemplaza a “T.”

“Polipéptido” se refiere a un polímero compuesto de restos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos ligados mediante enlaces peptídicos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos. Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automático. El término “proteína” se refiere generalmente a polipéptidos grandes. El término “péptido” se refiere generalmente a polipéptidos cortos. En el presente documento se utiliza la anotación convencional para representar secuencias polipeptídicas: el final a la izquierda de una secuencia de polipéptidos es el extremo amino; el final a la derecha de una secuencia de polipéptidos es el extremo carboxilo.

“Cebador” se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con un molde polinucleotídico diseñado y proporcionar un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario. Dicha síntesis ocurre cuando el cebador polinucleotídico se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, de un molde polinucleotídico complementario y de un agente para la polimerización tal como una ADN polimerasa. Un cebador es generalmente monocatenario, pero también puede ser bicatenario. Los cebadores son generalmente ácidos desoxirribonucleicos, pero también resulta útil una amplia serie de cebadores naturales y sintéticos para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario al molde para el cual está diseñado para hibridarse, que sirve como un sitio para el inicio de la síntesis, pero no es preciso que refleje la secuencia exacta del molde. En dicho caso, la hibridación específica del cebador con el molde depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse, por ejemplo, con residuos cromogénicos, radioactivos o fluorescentes y usarse como residuos detectables.

“Sonda”, cuando se usa en referencia a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con una secuencia diseñada de otro polinucleótido. Una sonda se hibrida específicamente con un polinucleótido complementario diana, pero no es preciso que refleje la secuencia complementaria exacta del molde. En dicho caso, la hibridación específica de la sonda con la diana depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse, por ejemplo, con residuos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como residuos detectables.

Un tratamiento “profiláctico” es un tratamiento que se administra a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o que solo muestra signos prematuros, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos de la invención pueden proporcionarse como un tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología o minimizar la gravedad de la patología, si se desarrolla.

“Polinucleótido recombinante” se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que de manera natural no están unidas entre sí. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede incluirse en un vector adecuado, y el vector puede usarse para recombinar una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido recombinante se denomina “célula hospedadora recombinante”. El gen se expresa después en la célula hospedadora recombinante para producir, por ejemplo, un “polipéptido recombinante”. Un

polipéptido recombinante también puede realizar una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosoma, etc.).

5 “Se hibrida específicamente con”, “hibridación específica” o “se hibrida selectivamente con” se refiere a la unión, a la formación de dúplex o a la hibridación de una molécula de ácido nucleico, preferentemente con una secuencia de nucleótidos particular, en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en un ADN o ARN (por ejemplo, celular total), en una mezcla compleja.

10 La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las cuales una sonda se hibridará preferentemente con su subsecuencia diana, y a un menor grado, o no del todo, con otras secuencias. La “hibridación rigurosa” y “las condiciones de lavado de hibridación rigurosas” en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tal como hibridaciones de Southern y Northern, son dependientes de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Una guía amplia sobre la hibridación de los ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte I
15 capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York. Generalmente, la hibridación y las condiciones de lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean a una temperatura aproximadamente 5 °C más baja que la del punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (con una fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente idéntica. Se seleccionan condiciones muy
20 rigurosas para que sean iguales a la T_f para una sonda particular.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es formalina al
25 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C, realizándose la hibridación durante una noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con 0,2X SSC a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook *et al.* para una descripción de tampón SSC). A menudo, un lavado muy riguroso está precedido por un lavado poco riguroso para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de un lavado riguroso medio para un dúplex de, por
30 ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado poco riguroso para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos. En general, una proporción de señal con respecto a interferencia de 2x (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.

35 Un “sujeto” de diagnóstico o tratamiento en un ser humano o animal no humano, incluyendo un mamífero o un primate.

Las frases “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente idénticas”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, generalmente se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de
40 nucleótidos o de restos de aminoácidos de al menos 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, cuando se comparan y se alinean para una obtener una máxima correspondencia, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Preferentemente, existe identidad sustancial sobre una región de las secuencias que es al menos de aproximadamente 50 restos de longitud, más preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 restos y más preferentemente las
45 secuencias son sustancialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas sobre toda la longitud de cualquiera o ambos biopolímeros de comparación.

Para la comparación de secuencias, generalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las
50 secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se diseñan coordenadas de subsecuencias, si fuera necesario, y se diseñan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa diseñado.

55 El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de analogía de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete del programa informático Genetics Wisconsin, Genetics
60 Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos, emparejados que muestran relación y porcentajes de
65 identidad de secuencia. También representa un árbol o dendrograma que muestra las relaciones en grupos usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y

Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351-360, 1987. El método que se usa es similar al método descrito por Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento emparejado de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo se
 5 alinea después con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una extensión múltiple del alineamiento emparejado de dos secuencias individuales. El alineamiento final se realiza mediante una serie de alineamientos de emparejamiento progresivo. El programa se ejecuta diseñando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y diseñando los parámetros del programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia
 10 puede compararse con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de relación de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos ponderados finales. Otro logaritmo que es útil para generar alineamientos múltiples de secuencias es Clustal W (Thompson *et al.*, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680, 1994).

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para la determinación del porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990. El programa informático para realizar análisis BLAST se encuentra disponible al público en el National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica la identificación inicial de pares de secuencias de alta puntuación (HSPs, *high scoring sequence pairs*) identificando palabras W (del inglés *words*) de longitud corta en la secuencia a
 20 investigar, que bien coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. La T (del inglés *threshold*) se refiere al umbral de puntuación de la palabra próxima (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990). Estos aciertos de palabra próxima inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar los HSPs más largos que las contenga. Los aciertos de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan
 25 lejos como aumente la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no emparejados; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye por la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa va de cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier
 30 secuencia. Los parámetros W, T y X, de algoritmo BLAST, determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M= 5, N= -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1989).

Además, para calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más baja (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría una coincidencia al azar entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más baja en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona inmunológicamente en cruzado con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. Por tanto, un polipéptido es en general sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos únicamente se diferencian por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe en el presente documento.

“Sustancialmente puro” o “aislado” significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar, más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura significa que aproximadamente del 80 % al 90 % o más de la especie macromolecular que está presente en la composición es la especie de interés purificada. La especie objeto está purificada a homogeneidad esencial (especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) y la composición consta esencialmente de una sola especie macromolecular. Las especies de disolventes, moléculas pequeñas (<500 daltons), estabilizantes (por ejemplo, BSA) y especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares para los fines de esta definición. En algunas realizaciones, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención están sustancialmente puras o aisladas. En

5 algunas realizaciones, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención están sustancialmente puras o aisladas con respecto a los materiales de partida macromoleculares utilizados en su síntesis. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención comprende una enzima sulfatasa lisosomal terapéutica aislada o sustancialmente purificada, mezclada con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento que se administra a un sujeto que presenta signos o síntomas de patología con la finalidad de disminuir o eliminar esos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden proporcionarse como un tratamiento terapéutico o de diagnóstico.

"Índice terapéutico" se refiere al intervalo de dosis (cantidad y/o medición del tiempo) por encima de la cantidad terapéutica mínima y por debajo de una cantidad inaceptablemente tóxica.

15 "Tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico o a tratamiento diagnóstico.

20 La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para seres humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de enzima sulfatasa lisosomal de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado junto con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen de la enzima sulfatasa lisosomal particular empleada y del efecto que vaya a obtenerse, y de las propiedades farmacodinámicas asociadas a cada enzima sulfatasa lisosomal en el hospedador.

25 II. Producción de enzimas sulfatasas lisosomales

30 En el presente documento se desvela un nuevo método de producción de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, en cantidades que permitan el uso terapéutico de dichas enzimas. En general, el método puede caracterizar la transformación de una línea celular adecuada con el ADNc que codifica el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) o un fragmento, mutante, variante o derivado del mismo, biológicamente activo, y un ADNc que codifica enzimas sulfatasas lisosomales de longitud completa en cantidades que permitan el uso terapéutico de dichas enzimas. En general, el método caracteriza la transformación de una línea celular adecuada con el ADNc que codifica el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano o un fragmento, mutante, variante o derivado del mismo, biológicamente activo, y un ADNc que codifica la enzima sulfatasa lisosomal de longitud completa o un fragmento, mutante, variante o derivado del mismo biológicamente activo. Los expertos en la técnica pueden preparar construcciones de expresión distintas de las expresamente descritas en el presente documento, para la producción óptima de dichas enzimas sulfatasas lisosomales, en líneas celulares transfectadas adecuadas con las mismas. Además, los expertos pueden diseñar fácilmente fragmentos de ADNc que codifiquen fragmentos, mutantes, variantes o derivados biológicamente activos del SUMF1 de origen natural o enzimas sulfatasas lisosomales que posean la misma actividad biológica o similar que la de las enzimas de longitud completa de origen natural.

Células hospedadoras

45 Las células hospedadoras que se usan para producir las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes puede ser líneas celulares deficientes en acidificación endosomal, caracterizadas por su capacidad para producir dichas enzimas sulfatasas lisosomales en cantidades que permitan el uso de la enzima desde el punto de vista terapéutico. En el presente documento se desvela la línea celular del grupo de complementación END3, denominada G71. En el presente documento se desvela una línea celular G71 que se ha adaptado para el crecimiento en cultivo en suspensión sin suero, denominada G71 S. En el presente documento también se desvelan derivados de las líneas celulares G71 y G71S que se han subclonado adicionalmente o que contienen diferentes plásmidos de expresión.

50 En el presente documento las células que contienen y expresan ADN o ARN que codifica una proteína recombinante se denominan células genéticamente modificadas. Las células de mamífero que contienen y expresan ADN o ARN que codifica la proteína recombinante se denominan células de mamífero genéticamente modificadas. La introducción del ADN o del ARN en las células es mediante un método de transfección conocido, tal como, por ejemplo, y sin limitación, electroporación, microinyección, bombardeo con microproyectiles, precipitación con fosfato de calcio, precipitación con fosfato de calcio modificado, tratamiento con lípidos catiónicos, fotoelectroporación, metodologías de fusión, transferencia mediada por receptores o precipitación con polibreno. Como alternativa, el ADN o el ARN pueden introducirse por infección con un vector vírico. Se describen métodos de producción de células, incluyendo células de mamífero, que expresan ADN o ARN que codifican una proteína recombinante, en las Solicitudes de Patente, en trámite junto con la presente, U.S. Ser. N.º 08/334,797, titulada "In Vivo Protein Production and Delivery System for Gene Therapy", de Richard F Selden, Douglas A. Treco y Michael W. Heartlein (presentada el 4 de noviembre de 1994); U.S. Ser. N.º 08/334,455, titulada "In Vivo Production and Delivery of Erythropoietin or Insulinotropin for Gene Therapy", de Richard F Selden, Douglas A. Treco y Michael W. Heartlein (presentada el 4 de noviembre de 1994) y U.S. Ser. N.º 08/231,439, titulada "Targeted Introduction of DNA Into

Primary or Secondary Cells and Their Use for Gene Therapy”, de Douglas A. Treco, Michael W. Heartlein y Richard F Selden (presentada el 20 de abril de 1994).

La célula hospedadora que se utiliza para producir enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes puede ser una línea celular deficiente en acidificación endosomal, caracterizada por su capacidad para producir dichas enzimas sulfatasas lisosomales en cantidades que permiten el uso de la enzima desde el punto de vista terapéutico. En el presente documento se desvela una línea celular del grupo de complementación END3, derivada de CHO-K1, denominada G71, y una línea celular G71S, que se ha adaptado para el crecimiento en un cultivo en suspensión sin suero, denominada G71S, que coexpresa el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y una enzima sulfatasa lisosomal recombinante, y que por tanto pueden producir altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas, como se especifica en el apartado de “DEFINICIONES”, permitiendo de este modo la producción a gran escala de enzimas sulfatasas lisosomales terapéuticas. La línea celular G71 o G71 S, o derivada de las mismas, puede expresar y segregar enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes en cantidades de al menos aproximadamente 0,5, preferentemente de al menos aproximadamente 0,75, más preferentemente al menos de aproximadamente 1,0, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 1,25 picogramos/célula/día.

Vectores y construcciones de ácido nucleico

Una construcción de ácido nucleico que se utiliza para expresar la proteína recombinante, ya sea el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano o la enzima sulfatasa lisosomal, o ambos, puede ser una construcción que se exprese de manera extracromosómica (de manera episomal) en las células de mamífero transfectadas o una que se integre, ya sea al azar o en un sitio diana preseleccionado a través de recombinación homóloga, en el genoma de la célula receptora. Una construcción que se expresa de manera extracromosómica, comprende, además de secuencias que codifican la proteína recombinante, secuencias suficientes para la expresión de la proteína en las células y, opcionalmente, para la replicación de la construcción. Esto incluye generalmente un promotor, un ADN que codifica la proteína recombinante y un sitio de poliadenilación. El ADN que codifica la proteína recombinante se coloca en la construcción de tal manera que su expresión esté bajo el control del promotor. Opcionalmente, la construcción puede contener componentes adicionales, tales como uno o más de los siguientes: un sitio de corte y empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador de selección bajo el control de un promotor apropiado, un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor apropiado y una región de unión a la matriz (MAR, por las siglas en inglés *Matrix Attachment Region*) u otro elemento conocido en la técnica que potencie la expresión de la región donde se inserta.

Cuando la construcción de ADN se integra en el genoma de la célula, es preciso incluir únicamente las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína recombinante. Opcionalmente, esto puede incluir una secuencia promotora y una secuencia potenciadora, uno o más sitios de poliadenilación, uno o más sitios de corte y empalme, secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más marcadores de selección, secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador amplificable, una región de unión a la matriz (MAR) u otro elemento conocido en la técnica que potencie la expresión de la región donde se inserta, y/o ADN homólogo al ADN genómico en la célula receptora, para dirigir la integración del ADN en un sitio seleccionado en el genoma (para dirigir ADN o secuencias de ADN).

Métodos de cultivo celular

Las células de mamífero que contienen el ADN o el ARN que codifica la proteína recombinante, se cultivan en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células y expresión del ADN o del ARN. Las células que expresan la proteína recombinante pueden identificarse, usando métodos conocidos y métodos descritos en el presente documento, y la proteína recombinante puede aislarse y purificarse, usando métodos conocidos y métodos también descritos en el presente documento, con o sin amplificación de la producción de proteína recombinante. La identificación puede realizarse, por ejemplo, explorando células de mamífero modificadas genéticamente que presentan un fenotipo indicativo de la presencia de ADN o de ARN que codifica la proteína recombinante, tal como exploración por PCR, exploración por análisis de transferencia de Southern o exploración para determinar la expresión de la proteína recombinante. La selección de células que contienen ADN incorporado que codifica la proteína recombinante, puede efectuarse incluyendo un marcador de selección en la construcción de ADN, con el cultivo posterior de las células transfectadas o infectadas que contienen un gen marcador de selección, en condiciones apropiadas para la supervivencia solo de aquellas células que expresen el gen marcador de selección. Además, la amplificación de la construcción de ADN introducida puede efectuarse cultivando células de mamífero modificadas genéticamente en condiciones apropiadas (por ejemplo, cultivando células de mamífero modificadas genéticamente que contengan un gen marcador amplificable en presencia de una concentración de un fármaco al cual únicamente pueden sobrevivir las células que contienen copias múltiples del gen marcador amplificable.

Las células de mamífero modificadas genéticamente que expresan la proteína recombinante pueden identificarse, como se describe en el presente documento, por detección del producto de expresión. Por ejemplo, las células de mamífero que expresan enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, pueden identificarse mediante un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich. Los anticuerpos pueden dirigirse hacia la parte activa del

agente.

Variantes de enzimas sulfatasas lisosomales

5 En determinadas realizaciones, pueden prepararse mutantes o variantes de enzimas sulfatasas lisosomales, altamente fosforiladas, activas, y serán útiles en diversas aplicaciones en las que puedan usarse las enzimas sulfatasas lisosomales, altamente fosforiladas, activas. Las secuencias de aminoácidos mutantes o variantes del polipéptido pueden ser mutantes o variantes de sustitución, inserción o delección. Los mutantes o variantes de delección carecen de uno o más restos de la proteína nativa que no son esenciales para la función o actividad inmunogénica. Un tipo común de mutante o variante de delección es uno que carece de secuencias señal secretoras o de secuencias señal que dirigen a una proteína a unirse a una parte particular de una célula. Los mutantes o variantes de inserción generalmente implican la adición del material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente de un solo resto. Las adiciones terminales, también denominadas proteínas de fusión, se analizan más adelante.

15 Las variantes pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas a la enzima sulfatasa lisosomal no modificada como se expone anteriormente. Son variantes preferidas las que son variantes de un polipéptido de la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada, activa, que conservan al menos algunas de las actividades biológicas, por ejemplo, actividad sulfatasa, de la enzima sulfatasa lisosomal. Otras variantes preferidas incluyen variantes de un polipéptido de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana que conservan al menos algunas de las actividades sulfatasas de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana.

20 Los mutantes o variantes de sustitución generalmente intercambian un aminoácido del polipéptido de tipo silvestre por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, tales como, por ejemplo, y sin limitación, estabilidad contra escisión proteolítica, sin perder otras funciones o propiedades. Las sustituciones de este tipo son preferentemente conservativas, es decir, un aminoácido se reemplaza con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina, arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina por metionina; serina por treonina, treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina.

25 En el presente documento se enseña la generación de mutantes o variantes de sitio de glicosilación en el que el sitio de glicosilación ligado a N o ligado a O de la enzima sulfatasa lisosomal se ha mutado. Dichos mutantes o variantes pueden ofrecer importante información en cuanto a la actividad biológica, estructura física y posible de unión a sustrato de la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa. En el presente documento se desvela que pueden generarse mutantes o variantes del polipéptido de la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa que conserven la actividad biológica pero que tengan una actividad de unión a sustrato aumentada o disminuida. Como tales, se contemplan mutaciones del sitio activo o de la región catalítica particularmente para generar mutantes o variantes de proteínas con actividad de unión a sustrato alterada. La secuencia de la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa puede compararse con la de las otras enzimas relacionadas y con restos seleccionados específicamente mutados.

35 Los aminoácidos de la proteína madura se numeran desde el supuesto extremo amino como aminoácido número 1, como mutaciones ejemplares que pueden usarse se incluyen, por ejemplo, sustitución de todas o de algunas asparaginas posiblemente glucosiladas, incluyendo las posiciones 178 y 397 de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante (véase la Figura 5).

40 La unión a sustrato puede modificarse con mutaciones en/cerca del sitio activo de la enzima sulfatasa lisosomal activa. Considerando que dichas mutaciones son ejemplares, los expertos en la técnica reconocerán que pueden realizarse otras mutaciones de la secuencia enzimática para proporcionar información estructural y funcional adicional acerca de esta proteína y su actividad.

45 Para construir mutantes o variantes tales como los descritos(as) anteriormente, un experto en la técnica puede emplear tecnologías convencionales muy conocidas. Se contemplan específicamente delecciones en N terminal, delecciones en C terminal, delecciones internas, así como mutagénesis al azar y puntual.

50 Las delecciones en N terminal y en C terminal son formas de mutagénesis por delección que se aprovechan, por ejemplo, de la presencia de un solo sitio de restricción adecuado cerca del extremo de la región C o N terminal. El ADN se escinde en el sitio y terminaciones cortadas se degradan por nucleasas tales como BAL31, exonucleasa III, DNasa I y nucleasa S1. La reunión de dos extremos produce una serie de ADN con delecciones de diverso tamaño alrededor del sitio de restricción. Las proteínas expresadas a partir de dicho mutante pueden ensayarse para determinar la función biológica apropiada, por ejemplo, actividad enzimática, usando técnicas convencionales conocidas en la materia y descritas en la memoria descriptiva. Para mutantes de delección interna pueden emplearse técnicas similares usando dos sitios de restricción colocados adecuadamente, permitiendo de este modo realizar

una delección definida con exactitud, y que los extremos vuelvan a ligarse como se ha indicado anteriormente.

También se contemplan mutantes de digestión parcial. En dichos casos, un experto en la técnica podría emplear un "cortador de frecuencia" que corta el ADN en numerosos lugares dependiendo de la duración del tiempo de reacción. Por tanto, modificando las condiciones de reacción, será posible generar una serie de mutantes de diverso tamaño, que después pueden explorarse con respecto a su actividad.

También puede realizarse una mutación de inserción al azar cortando la secuencia de ADN con una DNasa I, por ejemplo, e insertando un tramo de nucleótidos que codifique 3, 6, 9, 12, etc., aminoácidos y volviendo a ligar el extremo. Una vez realizada una mutación de este tipo, los mutantes pueden explorarse para determinar diversas actividades presentadas por la proteína de tipo silvestre.

También puede emplearse mutagénesis puntual para identificar con particularidad qué restos de aminoácidos son importantes en actividades particulares asociadas a la actividad biológica de la enzima sulfatasa lisosomal. Por tanto, un experto en la técnica podrá generar cambios de una sola base en la cadena de ADN para producir un codón alterado o una mutación de sentido erróneo.

Los aminoácidos de una proteína particular pueden alterarse para crear un equivalente, o incluso una molécula de segunda generación, mejorada. Dichas alteraciones contemplan la sustitución de un aminoácido determinado de la proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de anticuerpos de unión a antígeno o sitios de unión en receptores o moléculas sustrato. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína es lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, pueden realizarse determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y en su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, pueden realizarse diversos cambios en las secuencias de ADN de genes sin pérdida apreciable de su actividad o utilidad biológica, como se indica más adelante.

Al realizar dichos cambios, ha de considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Se acepta que el carácter hidropático relativo de los aminoácidos contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobia y carga (Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1): 105-132, 1982). Generalmente, los aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan una puntuación o un índice hidropático similar y seguir produciendo una proteína con actividad biológica similar, es decir, seguir obteniendo una proteína equivalente funcionalmente biológica.

Además, la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en función de la hidrofilia. La Patente U.S. 4.554.101 indica que el promedio local más elevado de hidrofilia de una proteína, regido por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como tal, un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofilia similar y seguir obteniendo una proteína inmunológica y biológicamente equivalente.

Como ejemplos de sustituciones de aminoácidos que pueden usarse en este contexto de la invención se incluyen, pero sin limitación, el intercambio de arginina y lisina; de glutamato y aspartato; de serina y treonina; de glutamina y asparagina; y de valina, leucina e isoleucina. Los expertos en la materia conocerán bien otras sustituciones de este tipo que tienen en cuenta la necesidad de conservar algunas o todas las actividades biológicas aunque se altere la estructura secundaria de la proteína.

Otro tipo de variante que se contempla para la preparación de polipéptidos de acuerdo con la invención es el uso de peptidomiméticos. Los miméticos son moléculas que contienen péptidos que imitan elementos de la estructura secundaria de la proteína. Véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" en BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman y Hall, Nueva York (1993). La lógica subyacente detrás del uso de los peptidomiméticos es que el esqueleto peptídico de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácidos de tal manera que se faciliten las interacciones moleculares, tales como las de un anticuerpo y un antígeno. Se espera que un péptidomimético permita interacciones moleculares similares a las de la molécula natural. Estos principios pueden usarse, junto con los principios descritos anteriormente, para diseñar moléculas de segunda generación que tengan muchas de las propiedades naturales de las enzimas sulfatasas lisosomales, pero con características alteradas e incluso mejoradas.

60 *Glicosilación modificada de las enzimas sulfatasas lisosomales*

También pueden producirse variantes de una enzima sulfata lisosomal altamente fosforilada activa que tengan un patrón de glicosilación modificado con respecto al polipéptido parental, por ejemplo, la delección de uno o más residuos de hidratos de carbono y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido nativo.

La glicosilación está generalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del residuo de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del residuo de hidrato de carbono con la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. Por tanto, pueden añadirse sitios de glicosilación ligados a N a un polipéptido, alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de estas secuencias tripeptídicas. Glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Pueden añadirse sitios de glicosilación ligados a O insertando o sustituyendo uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido original.

Intercambio de dominios

Diversas partes de las proteínas de enzima sulfatasa lisosomal poseen gran cantidad de homología de secuencia. En los polipéptidos de enzima sulfatasa lisosomal pueden identificarse mutaciones que pueden alterar su función. Estos estudios son posiblemente importantes por al menos dos razones. La primera es que proporcionan una expectativa razonable de que incluso otros homólogos, variantes alélicas y mutantes de este gen pueden existir en especies relacionadas, tales como rata, conejo, mono, gibón, chimpancé, simio, babuino, vaca, cerdo, caballo, oveja y gato. Después del aislamiento de estos homólogos, variantes y mutantes, y junto con otros análisis, pueden identificarse determinados dominios activos o funcionales. La segunda razón es que esto proporcionará un punto de partida para un análisis mutacional posterior de la molécula como se describe anteriormente. Una manera en la que esta información puede aprovecharse es en "intercambio de dominios".

El intercambio de dominios implica la generación de moléculas recombinantes usando polipéptidos diferentes aunque relacionados. Por ejemplo, comparando la secuencia de una enzima sulfatasa lisosomal, por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, con la de una enzima sulfatasa lisosomal similar de otra fuente y con mutantes y variantes alélicas de estos polipéptidos, se pueden hacer predicciones sobre las regiones funcionalmente significativas de estas moléculas. Por tanto es posible intercambiar dominios relacionados de estas moléculas en un esfuerzo para determinar la criticidad de estas regiones con respecto a la función enzimática y sus efectos en trastornos por depósito lisosomal. Estas moléculas pueden tener valor adicional ya que estas "quimeras" pueden diferenciarse de moléculas naturales, aunque posiblemente proporcionen la misma función o incluso potenciada.

Basándose en las numerosas enzimas sulfatasas lisosomales que ahora se identifican, análisis de mutaciones adicionales y su efecto previsto sobre la estructura secundaria se sumarán a este entendimiento. Se contempla que los mutantes que intercambian dominios entre las enzimas sulfatasas lisosomales proporcionarán información útil sobre la relación entre estructura/función de estas moléculas y los polipéptidos con los que interaccionan.

Proteínas de fusión

Además de las mutaciones descritas anteriormente, la presente invención también contempla la generación de un tipo especializado de variante de inserción conocido como proteína de fusión. Generalmente, esta molécula tiene toda o una parte sustancial de la molécula nativa, ligada al extremo N o C, a toda o una parte de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las fusiones generalmente emplean secuencias líder de otra especie para permitir la expresión recombinante de una proteína en un hospedador heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio de escisión en o cerca de la unión de la fusión, facilitará la retirada del polipéptido extraño después de la purificación. Otras fusiones útiles incluyen el ligamiento de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales de direccionamiento celular o regiones transmembrana.

Existen diversos sistemas de expresión de proteínas de fusión disponibles en el comercio que pueden usarse en la presente invención. Como sistemas particularmente útiles se incluyen, pero sin limitación, el sistema glutatión S-transferasa (GST) (Pharmacia, Piscataway, NJ), el sistema proteína de unión a maltosa (NEB, Beverly, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT), el sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estos sistemas pueden producir polipéptidos recombinantes que lleven solo un pequeño número de aminoácidos adicionales, que no es probable que afectan a la capacidad antigénica del polipéptido recombinante. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis añaden solo secuencias cortas, ambos de los cuales se sabe que son poco antigénicos y no afectan adversamente al plegamiento del polipéptido en su conformación nativa. Otra fusión N terminal que se contempla que es útil es la función de un dipéptido Met-Lys en la región N terminal de la proteína o péptidos. Dicha fusión puede producir aumentos beneficiosos en la expresión o actividad de la proteína.

Una construcción de fusión particularmente útil puede ser una en la que un polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa o un fragmento del mismo se fusiona con un hapteno para potenciar la inmunogenicidad de una construcción de fusión de enzima sulfatasa lisosomal. Esto puede ser útil en la producción de anticuerpos contra la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa para permitir la detección de la proteína. En otras realizaciones, puede crearse una construcción de fusión que potencie el direccionamiento de las composiciones relacionadas con la enzima sulfatasa lisosomal a un sitio o a una célula específicos.

Otras construcciones de fusión, incluyen un péptido heterólogo con propiedades deseadas, por ejemplo, un motivo que dirige la enzima sulfatasa lisosomal a un órgano, tejido o tipo de célula particular. En una realización preferida, una construcción de fusión incluye un péptido que se dirige a hueso, por ejemplo, 6 restos de ácido aspártico (6xAsp o 6D) fusionados a una enzima sulfatasa lisosomal pueden dirigir la enzima a sitios particulares en el hueso.

Para el direccionamiento también se contemplan otras construcciones de fusión, incluyendo un polipéptido heterólogo con propiedades deseadas, por ejemplo, una región constante de Ig para prolongar la semivida en suero o un anticuerpo o fragmento del mismo para dirigirse también. Otros sistemas de fusión producen híbridos de polipéptidos donde es deseable escindir el compañero de fusión del polipéptido deseado. En una realización, el compañero de fusión está ligado al polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa recombinante mediante una secuencia peptídica que contiene una secuencia de reconocimiento específica para una proteasa. Son ejemplos de secuencias adecuadas los reconocidos por la proteasa del Virus del Grabado Tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o el Factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

Derivados

Como se ha indicado anteriormente, un derivado se refiere a polipéptidos químicamente modificados por técnicas tales como, por ejemplo y sin limitación, ubiquitinación, marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión covalente con polímeros, tal como PEGilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina. Los derivados de la enzima sulfatasa lisosomal son también útiles como agentes terapéuticos y pueden producirse con los métodos de la invención.

El polietilenglicol (PEG) puede unirse a la enzima sulfatasa lisosomal producida por los métodos de la invención para proporcionar mayor semivida *in vivo*. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio del PEG variará preferentemente de aproximadamente 2 kiloDalton ("kDa) a aproximadamente 100 kDa, más preferentemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, más preferentemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG generalmente se unirán a las enzimas sulfatasa lisomales de la invención mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en el residuo de PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) a un grupo reactivo del residuo de proteína (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster). La adición de residuos de PEG a polipéptidos de interés puede realizarse usando técnicas muy conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 96/11953 y la Patente de Estados Unidos N.º 4.179.337.

El ligamiento del polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal con PEG normalmente se produce en fase acuosa y puede monitorizarse fácilmente mediante HPLC analítica de fase inversa. Los péptidos PEGilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse mediante HPLC analítica, mediante análisis de aminoácidos y mediante espectrometría de masas con desorción láser.

Marcadores

En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal terapéutica se marca para facilitar su detección. Un "marcador" o un "residuo detectable" es una composición que puede detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, como marcadores adecuados para su uso en la presente invención se incluyen, pero sin limitación, marcadores radioactivos (por ejemplo, ³²P), fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína), reactivos denso electrónicos, enzimas (por ejemplo, como las habitualmente usadas en un ensayo ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos, así como proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el hapteno o péptido, o usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o el péptido.

Como ejemplos de marcadores adecuados para su uso en la presente invención se incluyen, pero sin limitación, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras habitualmente usadas en un ensayo ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal, plástico o perlas de plástico de color (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado de la enzima sulfatasa lisosomal de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, en una realización el marcador está unido covalentemente a la enzima sulfatasa lisosomal usando un reactivo de isocianato para la conjugación de un agente activo de acuerdo con la invención. En un aspecto de la invención, los reactivos de isocianato bifuncionales de la invención pueden usarse para conjugar un marcador con una enzima sulfatasa lisosomal para formar un conjugado de enzima sulfatasa lisosomal - marcador sin un agente activo unido al mismo. El conjugado de enzima sulfatasa lisosomal - marcador puede usarse como un producto intermedio para la síntesis de un conjugado marcado de acuerdo con la invención o puede usarse para detectar el conjugado de enzima sulfatasa lisosomal. Como se indica anteriormente, pueden usarse diversos marcadores, seleccionándose el marcador dependiendo de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con el componente deseado de la enzima sulfatasa lisosomal, de los requisitos de estabilidad, de los equipos disponibles y de los suministros de eliminación. Los marcadores no

radioactivos a menudo se unen por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) está unida covalentemente a la enzima sulfatasa lisosomal. El ligando se une después a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), que es intrínsecamente detectable o está unida covalentemente a un sistema señalizador, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención también pueden conjugarse directamente con compuestos generadores de señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Como enzimas adecuadas para su uso como marcadores se incluyen, pero sin limitación, hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterases y glucosidasas, u oxidotasas, particularmente, peroxidasas. Los compuestos fluorescentes, es decir, fluoróforos, adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero sin limitación, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Otros ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero sin limitación, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina, rodamina, eritrosceína sulfonil cloruro B, rutenio (tris, bipyridinio), Rojo Texas, dinucleótido de nicotinamida y adenina, dinucleótido de adenina y flavina, etc. Los compuestos quimioluminiscentes adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero sin limitación, luciferina y 2,3-dihidroftalazinodionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas marcadores o productores de señales que pueden usarse en los métodos de la presente invención, véase la Patente de Estados Unidos N.º 4.391.904.

Los expertos en la técnica conocen bien medios para detectar marcadores. Por tanto, por ejemplo, cuando el marcador es radioactivo, los medios para detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica, como en una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, este puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectar la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, usando detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Asimismo, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando a la enzima sustratos apropiados y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes pueden detectarse simplemente observando el color asociado al marcador. Otros sistemas de marcaje y detección adecuados para su uso en los métodos de la presente invención serán fácilmente obvios para los expertos en la técnica. Dichos moduladores y ligandos marcados pueden usarse en el diagnóstico de una enfermedad o estado de salud.

En una realización preferida, el método comprende la etapa de producir enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, de líneas celulares con defectos en el tránsito endosomal. En una realización particularmente preferida, el método comprende la etapa de producir N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, altamente fosforilada, activa, de la línea celular CHO G71, o de una derivada de la misma. La producción de enzimas sulfatasas lisosomales, tales como GALNS, comprende las etapas de: (a) desarrollar una línea celular G71 o derivada de G71 que coexpresa una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) y el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano recombinante; (b) cultivar líneas celulares que coexpresen la enzima sulfatasa lisosomal humana y SUMF1; y (c) aumentar gradualmente las líneas celulares que coexpresen la enzima sulfatasa lisosomal humana y SUMF1 en un biorreactor, para la producción de enzimas sulfatasas lisosomales. Los ADNc de la enzima sulfatasa lisosomal humana, por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) y de SUMF1 humano se subclonaron en vectores de expresión de mamífero, básicamente como se describe en el presente documento más adelante.

Para el desarrollo de la línea celular, un clon de G71 o G71S adaptado para el crecimiento en cultivo de suspensión sin suero, se co-transfectó con un vector de expresión de mamífero de GALNS humana, con un vector de expresión de mamífero de SUMF1 humano y con un gen marcador de selección, y se seleccionaron transformantes estables. Después de una primera ronda de subclonación de transfectantes estables, se seleccionaron líneas celulares usando el sustrato fluorescente y específicamente diseñado. Las líneas celulares G71 o G71S se analizaron con respecto a la productividad específica de célula (pg de producto/célula) en centrifugadoras con microtransportadores o en cultivo en suspensión, respectivamente. Las mejores productoras de GALNS humana se identificaron y se aumentaron gradualmente en un biorreactor para la producción de material preclínico.

En el presente documento se enseña un ensayo basado en células para medir la actividad de una enzima lisosomal humana recombinante para degradar sustratos naturales. El método puede comprender (a) cultivar una célula humana aislada deficiente en la enzima lisosomal en condiciones en las que se acumulen sustratos naturales para la enzima lisosomal; (b) poner en contacto la célula con la enzima lisosomal; (c) producir la lisis de la célula; (d) añadir al lisado celular una enzima que (i) sea específica para los sustratos naturales y (2) escinda oligosacáridos pequeños de los sustratos naturales; (e) marcar los oligosacáridos pequeños con un residuo detectable; (f) separar opcionalmente los oligosacáridos pequeños marcados; (g) detectar los oligosacáridos pequeños marcados; y (h) determinar la actividad de la enzima lisosomal para degradar los sustratos naturales comparando (i) la cantidad de oligosacáridos pequeños marcados de las células que se han puesto en contacto con la enzima lisosomal con (ii) la cantidad de oligosacáridos pequeños marcados de las células que no se han puesto en contacto con la enzima lisosomal, en el que una reducción en (h)(i) en comparación con (h)(ii) indica la actividad de la enzima lisosomal para degradar sustratos naturales. En una realización, el oligosacárido pequeño es un mono-, di, o trisacárido. En una realización relacionada, el oligosacárido pequeño es un disacárido.

La enzima lisosomal es N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS).

Las células humanas adecuadas que pueden usarse en el ensayo basado en células incluyen cualquier célula humana que sea deficiente en la enzima lisosomal a ensayar, de tal manera que pueda acumular los sustratos naturales para la enzima lisosomal. Por ejemplo, pueden usarse células que presenten, de manera natural, una deficiencia completa (100 %) o parcial en actividad, por ejemplo, una reducción de 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más en actividad. Pueden usarse células que expresen una enzima mutante con actividad disminuida, o células procedentes de pacientes que padecen una enfermedad por depósito lisosomal, por ejemplo, una mucopolisacaridosis. Pueden usarse células alteradas de manera recombinante para desactivar (*knockout*) o reducir la actividad de la enzima lisosomal, por ejemplo, introduciendo una mutación en el gen codificante o en su promotor o en otra región reguladora. Pueden usarse células tratadas para reducir la actividad enzimática lisosomal, por ejemplo, tratadas con ARN antisentido o ARNi (ARN de interferencia) para reducir la expresión enzimática.

Los expertos en la materia pueden seleccionar enzimas adecuadas que escinden (digieren) oligosacáridos pequeños de hidratos de carbono y que son "específicas para" (es decir, digieren predominantemente) los sustratos naturales de la enzima lisosomal. Por ejemplo, para la detección de actividad de GALNS o GLB1 (enzimas que degradan queratán sulfato) la enzima de la etapa (d) puede ser queratanasa II o cualquier enzima que actúe principalmente sobre queratán sulfato. Como otro ejemplo, para detección de IDU, ARSB, IDS o GUSB (enzimas que degradan dermatán sulfato), la enzima de la etapa (d) puede ser Condroitinasa ABC o cualquier enzima que actúe principalmente sobre dermatán sulfato. Como otro ejemplo, para detección de IDU, IDS, SGHS, G6S o GUSB (enzimas que degradan heparán sulfato), la enzima de la etapa (d) puede ser Heparanasa I o Heparanasa II, o ambas. Como otro ejemplo más, para la detección de GAA (una enzima que degrada glucógeno), la enzima de la etapa (b) puede ser una α -amilasa o cualquier enzima que actúe principalmente sobre glucógeno.

Este método basado en células puede ser muy sensible para la detección de la actividad enzimática lisosomal. La actividad enzimática lisosomal puede ser detectable cuando la concentración de la enzima lisosomal es tan baja como de aproximadamente 10 nM, o de aproximadamente 5 nM, o de aproximadamente 1 nM, o de aproximadamente 0,75 nM, o de aproximadamente 0,5 nM, o de aproximadamente 0,25 nM, o de aproximadamente 0,1 nM, o de aproximadamente 0,05 nM, o de aproximadamente 0,01 nM, o de aproximadamente 0,005 nM, o de aproximadamente 1 pM o de aproximadamente 0,5 pM.

III. Purificación de enzimas sulfatasas lisosomales

El material del biorreactor que contenía la GALNS humana recombinante se filtró, se concentró 20 veces por ultrafiltración/diafiltración, y después se filtró a través de carbono activado antes de cargar en una columna de captura. El material del biorreactor concentrado se cargó en una columna de Sefarosa FF quelante con (Zn-IMAC) a una conductividad $\sim 55 \pm 5$ mS/cm, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0 y acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0 (tampón A), y después se eluyó con una mezcla de 70 % de tampón A y 30 % de acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 300 mM, pH 7,0 (tampón B). El eluato de la columna de Sefarosa FF quelante con Zn (Zn-IMAC) se ajustó a una conductividad de $\sim 6,0 \pm 0,55$ mS/cm y a un pH 7,0 y se cargó en un filtro Mustang Q para eliminar posibles virus. El filtrado de Mustang Q se ajustó a pH $4,5 \pm 0,1$, se filtró a través de un filtro CUNO 60ZA seguido de un filtro en línea de $0,2 \mu\text{m}$ y después se cargó en una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap (M), se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 y una mezcla de 80 % de tampón A (acetato/fosfato 10 mM, pH 5,0) y 20 % de tampón B (acetato/fosfato 10 mM, NaCl 250 mM, pH 5,0) y se eluyó con un gradiente lineal al 20 %-75 % de tampón B (en 80 % - 25 % de tampón A). El eluato de la columna Fractogel EMD SE Hi-Cap, se ajustó después a pH $3,0 \pm 0,1$ por la adición de tampón citrato 0,2 M, a un pH 3,4 para la inactivación de virus a pH bajo. El eluato de la columna Fractogel EMD SE Hi-Cap que experimentó inactivación de virus a pH bajo, se ajustó a NaCl 2 M y a pH 5,0 por la adición de tampón citrato 0,2 M, a pH 6,0 y después se cargó en una columna ToyoPearl Butyl 650 M, se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0 (tampón A), y después se eluyó una mezcla de 35 % de tampón A y 65 % de tampón B (acetato/fosfato 10 mM, pH 5,0). El tampón del eluato de ToyoPearl Butyl 650 M se cambió a NaOAc/HOAc 20 mM, NaH_2PO_4 50 mM, HCl arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (p/v), pH 5,4 y se ajustó a una concentración final de GALNS de 3 mg/ml. La GALNS, cuyo tampón se cambió y cuya concentración se ajustó, se filtró a través de un filtro para virus (DV20) y de un filtro para ADN (Mustang Q) para eliminar cualquier virus y ADN residual. Se añadió Polisorbato 20 o PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v), dando como resultado una sustancia farmacológica en bruto (BDS, *Bulk Drug Substance*). La BDS se conservó a 2-8 °C o se congeló.

Como alternativa, el material del biorreactor que contenía la GALNS humana recombinante se filtró, se concentró 20 veces por ultrafiltración/diafiltración y después se filtró a través de carbono activado antes de cargar en una columna de captura. El material del biorreactor concentrado se cargó en una columna de Sefarosa FF quelante con ZN (Zn-IMAC) a una conductividad de $\sim 55 \pm 5$ mS/cm, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0 y acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0 (tampón A), y después se eluyó con una mezcla de 70 % de tampón A y 30 % de acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 300 mM, pH 7,0 (tampón B). El eluato de la columna de Sefarosa quelante con Zn (Zn-IMAC) se filtró para eliminar los virus y se ajustó a un pH $4,5 \pm 0,1$ con acetato 1,75 M, a pH 4,0, se filtró a través de un filtro Millipore COHC, se mezcló con acetato/fosfato 10 mM, pH 4,5

a una proporción de 30:70 (v/v) y después se cargó en una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap (M) a una conductividad < 7 mS/cm, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 y una mezcla de 80 % de tampón A (acetato/fosfato 10 mM, pH 5,0) y 20 % de tampón B (acetato/fosfato 10 mM, NaCl 250 mM, pH 5,0) y se eluyó con un gradiente lineal de 20 %-75 % de tampón B (en 80 % - 25 % de tampón A). El eluato de la columna Fractogel EMD SE Hi-Cap se ajustó después a pH 3,0 ± 0,1 por adición de tampón citrato 0,4 M, pH 3,4 para la inactivación de virus a pH bajo. El eluato de la columna Fractogel EMD SE Hi-Cap que experimentó inactivación de virus a pH bajo se ajustó a NaCl 2 M y a pH 5 por adición de tampón citrato 0,4 M, pH 6,0, se mezcló con acetato/fosfato 10 mM, pH 5, que contenía NaCl 5 M para obtener una concentración de NaCl 2 M, y después se cargó en una columna ToyoPearl Butyl 650 M, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 4,4 ± 0,1 y acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2,5 M, pH 5,0 (tampón A), y después se eluyó un gradiente lineal de 100 % a 32 % de tampón A y de 0 % a 65 % de tampón B (acetato/fosfato 10 mM, pH 5,0), seguido de una mezcla de tampón A 32 % y tampón B 68 %. El tampón del eluato de ToyoPearl Butyl 650 M se cambió a NaOAc/HOAc 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, HCl arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (p/v), pH 5,4 y opcionalmente se ajustó a una concentración final de GALNS 3 mg/ml. La GALNS cuyo tampón se cambió y cuya concentración se ajustó, se filtró a través de un filtro para virus (DV20) y de un filtro para ADN (Mustang Q) para eliminar cualquier virus y ADN residual. Se añadió Polisorbato 20 (PS20) a una concentración final de 0,01 % (p/v), dando como resultado la sustancia farmacológica en bruto (BDS). La BDS se conservó a 2-8 °C o se congeló.

La purificación de la GALNS humana recombinante se ha descrito con detalle anteriormente, y la purificación de la GALNS humana recombinante siguiendo procedimientos modificados de los protocolos anteriores se ha descrito con detalle anteriormente.

La enzima GALNS humana recombinante se expresó en células G71S como se describe en el Ejemplo III y se purificó como describe en el Ejemplo V o Ejemplo VI. La GALNS humana recombinante purificada de la invención puede compararse con otras preparaciones documentadas de GALNS. Masue *et al.*, J. Biochem. 110: 965-970, 1991 describen la purificación y caracterización de GALNS de placenta humana. Se descubrió que la enzima purificada tenía un peso molecular de 120 kDa, que consistían en los polipéptidos de 40 kDa y 15 kDa, observándose que este último era una glucoproteína. Por tanto, parece que la enzima GALNS de Masue *et al.*, se corresponde con la forma procesada representada en la Figura 5. Bielicki *et al.*, Biochem. J. 279: 515-520, 1991 describen la purificación y caracterización de GALNS de hígado humano. Cuando se analizó con SDS-PAGE, la enzima tenía un peso molecular de 70 kDa en condiciones no reductoras y pesos moleculares de 57 kDa, 39 kDa y 19 kDa en condiciones reductoras. Bielicki *et al.*, Biochem J. 311: 333-339, 1995 describieron la purificación y caracterización de GALNS humana recombinante de células de ovario de hámster chino. Se descubrió que la enzima purificada en SDS-PAGE tenía un peso molecular de 58-60 kDa en condiciones no reductoras y un peso molecular de 55-57 kDa, 39 kDa y 38 kDa en condiciones reductoras. Por tanto, parece que las enzimas GALNS de Bielicki *et al.* se corresponden con una mezcla de la forma pre-procesada (precursora) de la enzima y la forma procesada representada en la Figura 5. En cambio, la enzima GALNS humana recombinante de la invención consiste, casi en su totalidad, en la forma precursora de la enzima (véase la Figura 9 y la Figura 12) o predominantemente (es decir, al menos aproximadamente un 85 %) en la forma precursora de la enzima (véase la Figura 10).

IV. Enzimas sulfatasas lisosomales y enfermedades por depósito lisosomal

La enzima sulfatasa lisosomal es una enzima de longitud completa, o cualquier fragmento, mutante, variante o derivado de la misma, que conserve al menos una cantidad sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 %, preferentemente al menos aproximadamente 75 % y más preferentemente al menos aproximadamente 90 %), sustancialmente toda, o toda la actividad terapéutica o biológica (por ejemplo, actividad sulfatasa) de la enzima.

En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal es una que, si no se expresa o se produce, o si su expresión o producción se reduce sustancialmente, puede dar lugar a una enfermedad, incluyendo pero sin limitación, enfermedades por depósito lisosomal. En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal es una que, si no se expresa o se produce, o si se reduce sustancialmente su expresión o producción, puede no dar lugar a una enfermedad, pero cuya ausencia o expresión o producción reducida está asociada a la enfermedad, incluyendo pero sin limitación, enfermedades por depósito lisosomal. Preferentemente, la enzima sulfatasa lisosomal procede o se obtiene de un ser humano.

Preferentemente, en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal, la enzima sulfatasa lisosomal es una enzima que se encuentra en una célula que, si no se expresa o se produce, o si está sustancialmente reducida en expresión o producción, daría lugar a una enfermedad por depósito lisosomal. Como alternativa, en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal, la enzima sulfatasa lisosomal es una enzima cuya ausencia o expresión o producción sustancialmente reducida está asociada a la enfermedad, aunque su ausencia o expresión o producción sustancialmente reducida puede no dar lugar en sí misma a la enfermedad. Preferentemente, la enzima sulfatasa lisosomal procede o se obtiene de un ser humano.

Preferentemente, la enzima es una enzima sulfatasa lisosomal, tal como arisulfatasa A (ARSA) (Registro de Genbank N.º NP_000478 (isoforma a), Registro de Genbank N.º NP_001078897 (isoforma b) y otras variantes),

5 arilsulfatasa B/N- N-acetilglucosamina-4-sulfatasa (ARSB) (Registro de Genbank N.º P15848), iduronato-2-sulfatasa (IDS) (Registro de Genbank N.º NP_000193 (isoforma a), Registro de Genbank N.º NP_006114 (isoforma b)), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH) (Registro de Genbank N.º NP_000190), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) (Registro de Genbank N.º NP_002067) y Galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) (Registro de Genbank N.º NP_000503). A continuación se expone una tabla de enfermedades por depósito lisosomal y las enzimas sulfatasas lisosomales deficientes en las mismas, que son útiles como agentes terapéuticos:

Enfermedad por depósito lisosomal	Deficiencia de sulfatasa lisosomal
Mucopolisacaridosis de tipo II síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIIA síndrome de Sanfilippo	Sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIID síndrome de Sanfilippo	N-Acetilglucosamina 6-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IVA síndrome de Morquio	N-Acetilgalactosamina-6-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo VI	N-Acetilgalactosamina 4-sulfatasa
Leucodistrofia metacromática (MLD)	Arilsulfatasa A
Deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD)	Sulfatasas múltiples

10 En realizaciones preferidas, la enzima sulfatasa lisosomal es una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante producida por una línea celular deficiente en acidificación endosomal. En realizaciones más preferidas, la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante es activa y tiene un alto nivel de oligosacáridos fosforilados como se especifica en el apartado "DEFINICIONES". En realizaciones más preferidas, la enzima sulfatasa lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, altamente fosforilada, activa.

15 Por tanto, las enfermedades por depósito lisosomal que pueden tratarse o prevenirse por la formulación de acuerdo con la presente invención incluyen síndrome de Morquio A o MPS IVA. En una realización particularmente preferida, la enzima sulfatasa lisosomal es tal que su deficiencia causa síndrome de Morquio A o MPS IVA.

20 Por tanto, de la tabla anterior, para cada enfermedad la enzima sulfatasa lisosomal comprendería preferentemente una deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal activa específica en la enfermedad. Por ejemplo, en los métodos que implican MPS II, la enzima preferida es la iduronato-2-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IIIA, la enzima preferida es la sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IIID, la enzima preferida es la N-acetilglucosamina-6-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IVA, la enzima preferida es la galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IV, la enzima preferida es la N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa. Para los métodos que implican la Leucodistrofia Metacromática (MLD), la enzima preferida es la arilsulfatasa A. Para los métodos que implican Deficiencia Múltiple de Sulfatasa (MSD), la enzima puede ser arilsulfatasa A, arilsulfatasa B/N-acetilglucosamina-4-sulfatasa, iduronato-2-sulfatasa, sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa, N-acetilglucosamina-sulfatasa o galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, y la enzima preferida es la galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa.

30 V. Mucopolisacaridosis de tipo IVA (síndrome de Morquio, MPS IVA)

35 La mucopolisacaridosis de tipo IVA (síndrome de Morquio, MPS IVA) es una enfermedad recesiva, autosómica, hereditaria, que pertenece al grupo de enfermedades por depósito de mucopolisacáridos. El síndrome de Morquio se produce por una deficiencia de una enzima lisosomal necesaria para la degradación de dos glucosaminoglicanos (GAG), queratán sulfato (KS) y condroitín-6-sulfato (C6S). Específicamente, la MPS IVA se caracteriza por la ausencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), y la excreción de KS en la orina. La ausencia de GALNS produce la acumulación de cantidades anormalmente grandes de mucopolisacáridos en el cartílago hialino, un componente principal de los tejidos esqueléticos. Todos los pacientes tienen una displasia esquelética sistémica.

40 Otros síntomas varían en cuanto a la gravedad entre pacientes y pueden incluir la pérdida auditiva, cataratas, inestabilidad espinal, cardiopatía valvular y problemas respiratorios, entre otros.

45 La GALNS hidroliza enlaces éster sulfato de la galactosa-6-sulfato de KS y N-acetilgalactosamina-6-sulfato de C6S. La GALNS humana se expresa como una proteína precursora de 55-60 kDa con solo 2 posibles sitios de glicosilación ligados a asparagina. La manosa-6-fosfato (M6P) es parte de los oligosacáridos presentes en la molécula de GALNS. La M6P es reconocida por un receptor en la superficie celular lisosomal y, por consiguiente, es crucial para la absorción eficaz de GALNS.

50 Al igual que todas las sulfatasas, la GALNS requiere procesarse mediante una enzima activadora de formilglicina (FGE) codificada por el gen del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) para aumentar la actividad. Debido a esta etapa de activación, que implica la modificación postraducciona de un resto de cisteína en el sitio activo en C_α-formilglicina (FGly), la sobreexpresión de sulfatasas recombinantes puede conducir a la producción de enzimas sulfatasas tanto con baja actividad específica (es decir, una mezcla de enzimas sulfatasas activadas y no activadas) como con títulos de producción bajos (es decir degradación y/o no secreción de sulfatasas no activadas).

55 En el presente documento se desvela una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana altamente fosforilada activa para el tratamiento del síndrome de Morquio y otras enfermedades, por ejemplo, deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD), que están causadas por, o asociadas a, una deficiencia en la enzima N-acetilgalactosamina-6-

sulfatasa. Dicha enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, humana, altamente fosforilada, activa, tiene la capacidad de localizarse en tejidos en los que se acumula KS y C6S, tiene niveles adecuados de M6P para la absorción eficaz, tiene un porcentaje suficientemente alto de FGly para la actividad enzimática y tiene niveles de producción relativamente altos.

Debe entenderse que los métodos descritos en el presente documento pueden ser aplicables para la producción de otras enzimas sulfatasas lisosomales, por ejemplo, arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B/N-acetilglucosamina 4-sulfatasa (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH) y N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S), útil para el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal que están causadas o caracterizadas por la deficiencia de las mismas.

VI. Composiciones farmacéuticas y administración

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden administrarse por diversas vías. Para las preparaciones orales, las enzimas sulfatasas lisosomales pueden usarse en solitario o en combinación con aditivos apropiados para constituir comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y si se desea, con diluyentes, agentes tampón, agentes humectantes, conservantes y agentes aromáticos.

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden formularse en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolas en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos sintéticos de ácidos alifáticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol y si se desea con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Las enzimas sulfatasa lisosomales de la invención pueden utilizarse para formulación en aerosol para administrarse por inhalación. Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Adicionalmente, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden fabricarse en supositorios mezclando con diversas bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como aceite cacao, carboceras y polietilenglicoles, que se funden a temperatura corporal, pero se solidifican a temperatura ambiente.

Las formas farmacéuticas unitarias de las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención para administración por vía oral o rectal, tal como jarabes, elixires y suspensiones pueden proporcionarse de manera que cada dosis unitaria, por ejemplo, una cucharadita de té, una cucharada, un comprimido o supositorio, contenga una cantidad predeterminada de una enzima sulfatasa lisosomal que contenga el agente activo. De manera similar, las formas farmacéuticas unitarias para administración por inyección o intravenosa pueden comprender la enzima sulfatasa lisosomal como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro transportador farmacéuticamente aceptable.

En el uso práctico, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden combinarse como el principio activo en mezcla íntima con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables de acuerdo con técnicas farmacéuticas convencionales de preparación de compuestos. El transportador, diluyente o excipiente puede adoptar diversas formas dependiendo de la forma de administración preferible deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones de la enzima sulfatasa lisosomal en forma farmacéutica oral, pueden emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromáticos, conservantes, agentes colorantes y similares en caso de preparaciones líquidas orales, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o transportadores tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y comprimidos, prefiriéndose las preparaciones sólidas orales sobre las preparaciones líquidas. La presente invención proporciona una formulación que comprende a) la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante purificada mediante un método que se enseña en el presente documento, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y que tiene una pureza de al menos 95 %, determinada por tinción con azul de Coomassie, cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, que tiene al menos una conversión del 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y que tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, estando al menos el 98 % de dicha enzima GALNS en forma precursora, determinada por SDS-CGE, y b) uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables que comprende: (i) una cantidad de tampón fosfato eficaz para reducir la desfosforilación de dicha enzima GALNS, en la que el tampón fosfato es NaH₂PO₄ a una concentración de

aproximadamente 25 mM a 75 mM; y (ii) una cantidad estabilizante de lo siguiente: una sal o tampón de arginina, opcionalmente clorhidrato de arginina, en el que la sal o tampón de arginina está a una concentración de aproximadamente 10 mM a 50 mM; un polisorbato, opcionalmente polisorbato 20 y un alcohol de azúcar trihidrico superior, opcionalmente sorbitol; en la que dicha formulación está a un pH de aproximadamente 5,0-5,8.

La presente invención proporciona también una formulación que comprende a) la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante purificada mediante un método que se enseña en el presente documento, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y que tiene una pureza de al menos 95 %, determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, que tienen al menos un 50 % de conversión del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y que tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, en la que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en la forma precursora, determinada por tinción con azul de Coomassie, cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras, y b) uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden: (i) NaOAc/HOAc y NaH₂PO₄ como agente tampón, en el que la concentración de NaOAc/HOAc es de aproximadamente 20 +/- 10 mM y la concentración de NaH₂PO₄ es de 50 +/- 25 mM; y (ii) HCl arginina, polisorbato 20 y sorbitol como estabilizantes, en el que la concentración de HCl arginina es de aproximadamente 30 +/- 20 mM, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente 0,01 % +/- 0,005 % (p/v) y la concentración de sorbitol es de aproximadamente 2,0 % +/- 1,0 % (p/v); y (iii) un pH de aproximadamente 5,4 +/- 0,4.

En algunas realizaciones, la formulación puede comprender un segundo agente tampón.

El segundo agente tampón puede ser cualquier agente adecuado para mantener un pH dentro del intervalo deseado. Los tampones adecuados incluyen Tris, citrato, succinato, acetato, gluconato u otros tampones ácidos orgánicos. En algunas realizaciones, el estabilizante es una sal o tampón de aminoácido opcionalmente una sal o tampón de arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina o ácido glutámico.

En algunas realizaciones, el estabilizante es un tensioactivo, opcionalmente un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos adecuados incluyen polisorbatos, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80, poloxámeros, por ejemplo, poloxámero 188 o 184, derivados de polioxietileno, derivados de polioxipropileno, monolaurato de sodio y SDS. Como ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos se incluyen alcoholes o fenoles de cadena lineal o ramificada alifáticos, primarios o secundarios con óxidos de alquileo, generalmente óxido de etileno y generalmente 6-30 grupos de óxido de etileno. Otros tensioactivos no iónicos conocidos incluyen mono o dialquilalcanolaminas, alquilpoliglucósidos y polihidroxiaminas de ácidos grasos. Como agentes no limitantes de tensioactivos aniónicos conocidos se incluyen sales de sodio, amonio y mono-, di- y trietanolamina de sulfatos de alquilo, alquil éter sulfatos, alquilaril sulfonatos, alquilsuccinatos, alquilsulfosuccinato, N-alquil sarcosinatos, alquil fosfatos, alquil éter fosfatos, alquil éter carboxilatos y α -olefín sulfonatos. Los grupos alquilo generalmente contienen de 8 a 18 átomos de carbono y pueden ser insaturados. Los alquil éter sulfatos, alquil éter fosfatos y alquil éter carboxilatos pueden contener de 1 a 10 unidades de óxido de propileno u óxido de etileno por molécula y preferentemente contienen de 2 a 3 unidades de óxido de etileno por molécula. Los tensioactivos aniónicos conocidos incluyen laurilsulfato sódico o amónico y lauril éter sulfato sódico o amónico. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos anfotéricos conocidos incluyen óxidos de alquil amina, alquil betainas, alquil imidopropil betainas, alquil sulfobetainas, alquil glicinatos, alquil carboxiglicinatos, alquil anpropionatos, alquil amidopropil hidroxisultainas, acil tauratos, y acil glutamatos, en los que los grupos alquilo y acilo tienen de 8 a 18 átomos de carbono.

En algunas realizaciones, el estabilizante es un poliol o azúcar, preferentemente un alcohol de azúcar trihidrico superior. Los polioles adecuados incluyen eritritol, arabitol, maltitol, celobiitol, lactitol, manitol, treitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y glicerina. Los polioles conocidos incluyen alcoholes derivados de lactosa, trehalosa y estaquiosa. Los azúcares no reductores conocidos incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melecitosa y rafinosa. Los azúcares conocidos también incluyen xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa, trisacáridos tales como rafinosa y polisacáridos tales como dextrano.

Un método de prevención de la desfosforilación de la enzima GALNS humana recombinante purificada, comprende mezclar dicha enzima GALNS en una cantidad eficaz de un tampón fosfato para reducir la desfosforilación, opcionalmente a una concentración final entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 75 mM de tampón fosfato como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, la enzima GALNS humana recombinante purificada también se mezcla con un segundo agente tampón, incluyendo cualquiera de los agentes descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la enzima también se mezcla con una cantidad estabilizante de uno o más estabilizantes seleccionados del grupo que consiste en sales de aminoácido, tampones de aminoácido, tensioactivos y polioles. En realizaciones ejemplares, la cantidad de desfosforilación se reduce en comparación con una formulación de la misma enzima en tampón fosfato 1 Mm, por ejemplo, cuando se ensayan después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses de conservación a temperatura ambiente (por ejemplo, 25 °C). En realizaciones específicas, el ensayo de estabilidad acelerado se realiza después de conservación durante dichos periodos de tiempo a 40 °C.

En determinadas realizaciones, la reducción en cuanto a la desfosforilación en la formulación de GALNS (en comparación con el tampón fosfato 1 mM) puede ser de al menos aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 % o aproximadamente 50 % o mayor. En otra realización, el

nivel de manosa 7 bisfosforilada (BPM7) en la GALNS en la formulación es de aproximadamente 25 % a aproximadamente 40 %, o de aproximadamente 30 % a 35 %.

5 En realizaciones de cualquiera de las formulaciones o métodos anteriores, la enzima GALNS es una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y (i) tiene una pureza de al menos aproximadamente 95 % determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, (ii) tiene al menos aproximadamente una conversión del 80 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y (iii) tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por
10 cadena de proteína monomérica, en el que al menos el 98 %, al menos el 98,5 %, al menos el 99 % o al menos el 99,5 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras, o mediante electroforesis capilar en gel con SDS (SDS-CGE).

15 Con respecto a las vías de administración transdérmicas, los métodos para administración transdérmica de fármacos se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edición, (Gennaro *et al.*, Eds. Mack Publishing Co., 1985). Los parches dérmicos o cutáneos son medios preferidos para el suministro transdérmico de las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención. Los parches proporcionan preferentemente una absorción potenciada tal como DMSO para aumentar la absorción de las enzimas sulfatasas lisosomales. En las patentes de Estados Unidos Nos. 5.962.012, 6.261.595 y 6.261.595 se desvelan otros métodos para el suministro transdérmico de fármacos.

20 En el comercio se dispone de excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, transportadores o diluyentes. Además, sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente tales como agentes ajustadores de pH y de tampón, agentes ajustadores de tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares también se encuentran disponibles en el comercio.

25 En cada uno de estos aspectos, las composiciones de la enzima sulfatasa lisosomal incluyen, pero sin limitación, composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular o intravenosa), pulmonar (inhalación nasal o bucal), o administración nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dependerá, en parte, de la naturaleza y de la gravedad de las afecciones que vayan a tratarse y de la naturaleza del principio activo. Las vías de administración ejemplares son las vías oral e intravenosa. Las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

30 Debido a su fácil administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma farmacéutica unitaria por vía oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean, como es obvio, transportadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con técnicas acuosas o no acuosas convencionales. El porcentaje de una enzima sulfatasa lisosomal activa en estas composiciones puede, por supuesto, variar y puede estar convenientemente entre el 2 por ciento a aproximadamente el 60 por ciento del peso de la unidad.

35 Las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal de la invención pueden administrarse encapsuladas en, o unidas a, envolturas de virus o vesículas, o incorporadas en células. Las vesículas son partículas micelares que normalmente son esféricas y frecuentemente lipídicas. Los liposomas son vesículas formadas de una membrana bicapa. Las vesículas adecuadas incluyen, pero sin limitación, vesículas unilamelares y vesículas lipídicas multilamelares o liposomas. Dichas vesículas y liposomas pueden prepararse a partir de una amplia serie de compuestos lipídicos o fosfolipídicos, tales como fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiolina, glucolípidos, gangliósidos, etc., usando técnicas convencionales, tales como las descritas por ejemplo en la patente de Estados Unidos N.º 4.394.448. Dichas vesículas o liposomas pueden usarse para administrar las enzimas sulfatasas lisosomales por vía intracelular y para suministrar enzimas sulfatasas lisosomales a los órganos diana. La liberación controlada de una enzima sulfatasa lisosomal de interés también
40 puede realizarse usando encapsulación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.186.941).

45 Puede usarse cualquier vía de administración que diluya la composición de la enzima sulfatasa lisosomal en la corriente sanguínea, o preferentemente, al menos fuera de la barrera hematoencefálica. Preferentemente, las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal se administran por vía periférica, más preferentemente por vía intravenosa o por catéter cardíaco. También pueden ser útiles inyecciones intrayugulares e intracarótidas. Las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal pueden administrarse por vía local o regional, tal como por vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En un aspecto, las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal se administran con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

50 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de las dosis pueden variar en función de la enzima sulfatasa lisosomal, de la gravedad de los síntomas y de la susceptibilidad del sujeto con respecto a efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para una enzima sulfatasa lisosomal determinada son fácilmente determinables por el experto en la técnica por diversos medios incluyendo, pero sin limitación, evaluaciones de respuesta a dosis y parámetros farmacocinéticos realizadas en pacientes, en animales de ensayo e *in vitro*.

65

Las dosificaciones a administrar también dependerán de las necesidades individuales, del efecto deseado, de la enzima sulfatasa lisosomal particular usada y de la elección de la vía de administración. El intervalo de dosificación de una enzima sulfatasa lisosomal varía de aproximadamente 0,2 pmol/kg a aproximadamente 20 nmol/kg, prefiriéndose particularmente un intervalo de dosis de 2 pmol/kg a 2 nmol/kg, y particularmente de 2 pmol/kg a 200 pmol/kg. Como alternativa, el intervalo de dosificación de la enzima sulfatasa lisosomal puede ser de 0,01 a 1.000 mg/kg, prefiriéndose intervalos de dosificación de 0,1 a 100 mg/kg, y prefiriéndose particularmente de 0,1 a 10 mg/kg. Estas dosificaciones estarán influenciadas, por ejemplo y sin limitación, por la enzima sulfatasa lisosomal particular, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, y el sitio de acción de la enzima sulfatasa lisosomal particular.

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención son útiles para intervención terapéutica, profiláctica y diagnóstica en animales, y en particular en seres humanos. Las enzimas sulfatasas lisosomales pueden mostrar acumulación preferencial en tejidos particulares. Las indicaciones médicas preferidas para usos diagnósticos incluyen, por ejemplo, cualquier afección asociada a un órgano diana de interés (por ejemplo, pulmón, hígado, riñón, bazo).

Los métodos en cuestión encuentran uso en el tratamiento de diversas patologías. En determinadas realizaciones, es de particular interés el uso de los métodos en cuestión en patologías en las que la enzima sulfatasa lisosomal con actividad deseada se ha identificado previamente, pero en los que la enzima sulfatasa lisosomal no se suministra adecuadamente al sitio, zona o compartimento diana para producir un resultado terapéutico completamente satisfactorio. Con dichas enzimas sulfatasas lisosomales, pueden usarse métodos en cuestión para producir enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, para potenciar la eficacia terapéutica y el índice terapéutico de la enzima sulfatasa lisosomal.

Tratamiento significa extender cualquier resultado beneficioso a un sujeto asociado a la administración de una enzima sulfatasa lisosomal, incluyendo una probabilidad reducida de adquirir una enfermedad, la prevención de una enfermedad, la disminución, la detención o la reversión, la progresión de una enfermedad o una mejora de los síntomas asociados a la enfermedad que padece el hospedador, en el que la mejora o el beneficio se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, un síntoma, asociado a la afección patológica que va a tratarse, tal como inflamación y dolor asociado con esta. Como tal, el tratamiento también incluye situaciones en las que la afección patológica, o al menos los síntomas asociados a la misma, se inhiben por completo, por ejemplo, previniendo la aparición de la enfermedad o deteniéndola, por ejemplo, poniendo fin a la misma, de tal manera que el hospedador ya no padezca la afección patológica o al menos no padezca más los síntomas que caracterizan a dicha afección patológica.

De acuerdo con los métodos en cuestión pueden tratarse diversos hospedadores o sujetos. Generalmente dichos hospedadores son "mamíferos", o pertenecen a la clase *Mammalia*, utilizándose estos términos en general para describir organismos que pertenecen a dicha clase, incluyendo los órdenes carnívoros (por ejemplo perros y gatos), *roedores* (por ejemplo ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los hospedadores serán seres humanos.

Ejemplos

Ejemplo I

Vectores de expresión de mamíferos para el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

El objetivo fue construir vectores de expresión de mamífero apropiados para la producción en células establemente transfectadas de cantidades de enzimas sulfatasa lisosomales activas con niveles de fosforilación mejorados.

El ADNc del factor 1 de modificación de sulfatasas (SUMF1) humano de longitud completa (véase la solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 20005/0123949, fecha de publicación 9 de junio de 2005 y US 2004/0229250, fecha de publicación 8 de noviembre de 2004), que codifica un polipéptido 374 aminoácidos, se clonó en el vector de expresión de mamífero cDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene el promotor-potenciador del CMV y un sitio de clonación múltiple. La terminación de la transcripción eficaz se garantizó por la presencia de la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El marcador de selección fue el gen de resistencia a zeocina bajo el control del promotor EM-7 y la secuencia de poliadenilación temprana de SV40. El plásmido resultante se denominó pcDNA4 SUMF1. En la **Figura 1** y **Figura 2**, respectivamente, se muestran las secuencias polinucleotídicas (SEQ ID NO: 1) y polipeptídicas (SEQ ID NO: 2) de SUMF1 humano.

El ADNc de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana de longitud completa (véase Tomatsu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 181(2): 677-683, 1991), que codifica un polipéptido de 522 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 26 aminoácidos, se clonó en el vector de expresión de mamífero pCIN (BioMarin), que contiene el promotor-potenciador de CMV humano ligado al intrón IVS2 de la β -globina de conejo y un sitio de clonación múltiple. La terminación de la transcripción eficaz se garantizó por la presencia de la secuencia de

poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El marcador de selección fue un gen neomicina fosfotransferasa que lleva una mutación puntual para disminuir la eficiencia de la enzima. El marcador atenuado se alteró adicionalmente con el promotor de HSV-tk débil. El plásmido resultante se denominó pCIN 4A. Las secuencias polinucleotídicas (SEQ ID NO: 3) y polipeptídicas (SEQ ID NO: 4) de la GALNS humana se muestran en la **Figura 3** y **Figura 4**, respectivamente.

Para aumentar los niveles de expresión de SUMF1 y GALNS, se clonaron los elementos de la región de unión del armazón/matriz (MAR) (véase Mermoud *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 7.129.062) en los plásmidos de expresión de SUMF1 y GALNS.

BMAR SUMF1 se obtuvo por digestión de MAR relleno con P<1_68 X_X NcoI (Selexis) con BamHI y HincII, y la posterior inserción del fragmento MAR liberado en pcDNA4 SUMF1 digerido con BglIII y NruI.

PMAR SUMF1 se obtuvo por digestión de (MAR) SV40 EGFP relleno con P<1_68 NcoI (Selexis) con HindIII y XbaI para retirar el gen EGFP y la posterior inserción del gen SUMF1, que se liberó de pcDNA4 SUMF1 por digestión con HindIII y XbaI.

BMAR 4A se obtuvo por digestión de BMAR SUMF1 con PmeI y SpeI para retirar el gen SUMF1, y la posterior inserción del gen GALNS, que se liberó de pCIN 4A por digestión con PmeI y SpeI.

PMAR 4A se obtuvo por digestión de (MAR) SV40 EGFP relleno con P<1_68 NcoI (Selexis) con HindIII y XbaI para retirar el gen EGFP, y la posterior inserción del gen GALNS, que se liberó de pCIN 4A por digestión con HindIII y XbaI.

El ADNc de GALNS humano de longitud completa también se clonó en el vector de expresión de mamífero pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). pcDNA4 SUMF1 se digirió con HindIII y XbaI para retirar el ADNc de SUMF1 y pCIN 4A se digirió con HindIII y XbaI para aislar el ADNc de GALNS. El fragmento de ADNc de GALNS digerido con HindIII/XbaI se ligó en el fragmento del vector pcDNA4 digerido con HindIII/XbaI. El plásmido resultante se denominó pcDNA4-4A.

La integridad del gen GALNS en los vectores de expresión pCIN 4A, BMAR y pcDNA4-4A se confirmó por mapeo de restricción usando enzimas obtenidas en New England Biolabs. El vector de expresión PMAR 4A no se mapeó.

La estructura de la forma completamente procesada de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana se representa en la **Figura 5**. GALNS se expresa en un polipéptido de 522 aminoácidos con una secuencia peptídica señal de 26 aminoácidos. Un polipéptido GALNS de 496 aminoácidos se segrega como una forma preprocesada (precursora) de la enzima que tiene un peso molecular de aproximadamente 55-60 kDa. En la GALNS activa, el resto de cisteína en la posición 53 del precursor o del polipéptido GALNS completamente procesado (correspondiente a la posición 79 del polipéptido GALNS de longitud completa) se ha convertido en C_α-formilglicina (FGly) por el factor 1 de modificación de sulfatasas (SUMF1). En el lisosoma, GALNS se escinde después de la posición 325 del polipéptido GALNS completamente procesado, dando como resultado fragmentos peptídicos GALNS de aproximadamente 40 kDa y 19 kDa. Estos péptidos GALNS se unen mediante un puente disulfuro en el que los restos de cisteína (C) en las posiciones 282 y 393 del polipéptido GALNS completamente procesado. Hay dos sitios de glucosilación ligados a N canónicos, en las posiciones 178 y 397 del polipéptido GALNS completamente procesado. La manosa 7 bis-fosforilada (BPM7), que comprende dos restos de manosa-6-fosfato, se ha encontrado en N178, pero no en N397.

Ejemplo II

Líneas celulares G71S que coexpresan el factor 1 de modificación de sulfatasas (SUMF1) humano y la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

El objetivo fue desarrollar líneas celulares capaces de producir enzimas sulfatasas lisosomales activas con niveles de fosforilación mejorados.

Las células G71 (Rockford K. Draper) se obtuvieron directamente a partir de CHO-K1 (ATCC CCL-61). La línea celular G71 es un mutante sensible a la temperatura de CHO-K1 con respecto a la acidificación de los endosomas, que, según se ha observado, produce diferencias en la secreción de proteína total y la fosforilación en restos de manosa para varias enzimas a temperaturas elevadas (Park *et al.*, *Somat. Cell Mol. Genet.* 17(2): 137-150, 1991; Marnell *et al.*, *J. Cell. Biol.* 99(6): 1907-1916, 1984).

Se mantuvieron células G71 a 34 °C en medio UltraCHO de BioWhittaker complementado con suero de ternero fetal al 2,5 %, glutamina 2 mM, gentamicina y anfotericina.

Para permitir un uso más fácil de las líneas celulares para la producción de proteínas, las células G71 adherentes se adaptaron previamente a un medio de crecimiento aséptico usando un protocolo para adaptar células de mamífero

dependientes de suero, dependientes de anclaje, a un cultivo en suspensión asérico de alta densidad (Sinacore *et al.*, Mol. Biotechnol. 15(3): 249-257, 2000), dando como resultado una línea celular adaptada a un cultivo en suspensión asérico, G71S. Como alternativa, las células G71 adherentes, después de haberse transfectado de manera estable como se describe más adelante, pueden adaptarse a medio de crecimiento asérico como se indica en Sinacore *et al.*

Combinaciones emparejadas de vectores de expresión SUMF1 humano y GALNS humano (Ejemplo I), pcDNA4 SUMF1 más pCIN4 4A, BMAR SUMF1 más BMAR 4A, o PMAR SUMF1 más PMAR 4A, se transfectaron siguiendo el protocolo MARtech II como describe Selexis en células G71S cultivadas en medio de cultivo complementado con solución antibiótica-antimicótica (penicilina 100 UI, estreptomycin 10 mg, anfotericina B 25 µg, Cellgro). Los grupos transfectantes se cultivaron en medio UltraCHO (Cambrex) complementado con suero bovino fetal sometido a irradiación y al 5 % (FBS, JRH), G418 200 µg/ml (AG Scientific) y zeocina 200 µg/ml (Invitrogen), y se clonaron por dilución limitante en placas de 96 pocillos en el mismo medio de cultivo. El crecimiento del clon se supervisó mediante la formación de imágenes Cell Screen (Innovatis). Todos los clones se exploraron usando un ELISA de actividad de captura enzimática para GALNS activa (véase el **Ejemplo IV**). La productividad celular se calculó dividiendo el ELISA actividad de captura enzimática para la actividad GALNS entre el crecimiento celular (Vi-Cell, Beckman Coulter) por día, durante un periodo de 4 días.

Se generaron 202 clones G71S y se exploraron con respecto a la GALNS activa: 86 clones cotransfectados con pcDNA4 SUMF1 más pCIN 4A, 65 clones cotransfectados con BMAR SUMF1 más BMAR 4A y 51 clones cotransfectados con PMAR SUMF1 más PMAR 4A. Los clones se seleccionaron inicialmente basándose en los altos niveles de GALNS activa en las placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (**Figura 6A**). La actividad de GALNS se midió usando un ELISA de actividad de captura enzimática y se representó en ng/ml (eje y). El eje x muestra las tres condiciones de cotransfección usadas para la expresión de SUMF1 y GALNS: promotor de hCMV sin MAR, promotor de hCMV con MAR y promotor de SV40 con MAR. Cada barra representa un solo clon de la población respectiva. La densidad celular no se tuvo en cuenta para esta exploración del clon de 96 pocillos y no todos los clones G71S cotransfectados se representan en esta figura.

Para los análisis de productividad, se seleccionaron los clones G71S productores de GALNS más activos (**Figura 6B**). La productividad celular diaria se midió en pg/célula/día y se obtuvo dividiendo la actividad de GALNS entre la densidad celular para ese día. La figura representa el cuarto día (96 horas) después de la siembra a 5×10^5 células/matraz. Los clones se ensayaron con respecto a GALNS usando un ELISA de actividad de captura enzimática en pg/célula/día (eje y). Los controles positivos consistían en clones BHK y CHO que expresaban GALNS (BioMarin). Cada barra vertical representa un solo clon. Se produjo GALNS activa por clones pCIN 4A, pero solamente marginalmente por encima del nivel de fondo del ensayo.

Los análisis de los clones por exploración de 96 pocillos y el ensayo de productividad de 4 días demostraron que la cotransfección de los vectores de expresión con elementos MAR aumentaba la productividad de clones G71S en comparación con la cotransfección de los vectores de expresión sin elementos MAR. Los clones cotransfectados con BMAR 4A + BMAR SUMF1 demostraron una rápida generación de grupos, un rápido crecimiento del clon y capacidad para producir GALNS más de 2 veces más activas en comparación con clones PMAR 4A de máxima producción y un aumento de hasta 10 veces con respecto a los clones CHO 4A y BHK 4A que carecían de elementos MAR.

Los clones G71S que expresaban GALNS se adaptaron a medio de crecimiento asérico usando el protocolo indicado en Sinacore *et al.*, Mol. Biotechnol. 15(3): 249-257, 2000. Toda la adaptación se realizó en presencia de los dos agentes de selección (zeocina a 200 µg/ml y neomicina a 200 µg/ml). Los clones G71 que expresaban GALNS cultivados en matraces de tipo T se dividieron de la siguiente manera: (1) en un agitador de 125 ml con el medio UltraCHO Cambrex y FBS al 5 % (lote n.º 8L2242); (2) en un agitador de 125 ml con el medio JRH 302M (medio de producción) y FBS al 5 %; y (3) en matraces de tipo T como una copia de seguridad (UltraCHO, FBS al 5 %). Una vez establecidos los cultivos de suspensión, se desecharon las células adherentes y se inició la retirada de FBS. Cuando la tasa de crecimiento volvió a $> 0,5$ (1/día) durante 3 pases y la viabilidad fue > 95 %, la concentración de FBS se redujo al 50 %. Las células se dejaron en cualquier concentración de FBS dada durante un mínimo de 3 pases. Una vez adaptadas al crecimiento en FBS al 2,5 %, las células se pusieron directamente en medio asérico. Las células se reservaron en medio nuevo con DMSO al 10 % (v/v). Se probó un ensayo de descongelación para garantizar que las células sobrevivían al proceso de congelación. Dos clones G71S que expresaban GALNS procedentes de la transfección BMAR 4A + BMAR SUMF1, los clones 4 y 5, tardaron aproximadamente 15 pases para su adaptación a medio de suspensión asérico. Un clon que expresaba GALNS proveniente de la transfección pcDNA4 SUMF1 más pCIN 4A, C6, también se aisló y se adaptó a cultivo asérico.

Las combinaciones emparejadas de los vectores de expresión SUMF1 humano y GALNS humano (Ejemplo I), pcDNA4 SUMF1 más pCDNA4-4A, se introdujeron en células G71S por transfección básicamente como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que se usaron 200 µg/ml de Zeocina (Invitrogen) para la selección. Se aislaron seis clones que expresaban GALNS, C2, C5, C7, C10, C11 y C30, y se adaptaron al cultivo de suspensión asérico básicamente como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO III

Cultivo a gran escala de líneas celulares G71S que expresan N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

5 El objetivo fue medir la producción enzimática a partir de clones G71S que expresaban N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana. Líneas celulares G71S adaptadas en cultivo suspensión asérico que coexpresaban SUMF1 humano y GALNS humana se cultivaron a gran escala y se evaluaron con respecto a la producción enzimática de GALNS activa.

10 Dado que la adaptación al cultivo de suspensión asérico fue relativamente rápida para la línea celular hospedadora G71S, se decidió que la producción podría realizarse en un biorreactor WAVE que funciona en modo perfusión. El biorreactor WAVE permite una mayor flexibilidad en el volumen del inóculo porque el aumento de escala puede realizarse directamente en la bolsa, reduciéndose el riesgo de contaminación y acelerándose la producción de material. La **Figura 7** muestra la configuración esquemática del biorreactor WAVE. El diagrama muestra, en modo de perfusión, que una célula de carga supervisa el volumen medio en la bolsa determinando el peso de la bolsa y ajustando las tasas de suministro y recogida para mantener el volumen deseado. En la bolsa de 10 l, el pH también se controla en el punto deseado por una sonda que se inserta en la bolsa.

20 El material de los clones G71S que expresaban GALNS 4 y 5 se produjo a escala de 1 l. El pH del cultivo no se controló en estas rondas. La limitación operativa de la bolsa WAVE es un rendimiento de volúmenes de 3 recipientes por día (VV/día). Para impedir que se produjera cualquier inactivación de material, la tasa de perfusión específica de célula diana (CSPR) fue 0,3 nl/célula/día, dando como resultado un tiempo de residencia promedio de ocho horas para las enzimas GALNS. Por lo tanto, la densidad celular en la bolsa se mantuvo a aproximadamente $10\text{-}12 \times 10^6$ células/ml. La tasa de crecimiento para clones G71S que expresaban GALNS 4 y 5 fue de 0,16 y 0,20, respectivamente. Las extracciones sanguíneas para mantener la densidad celular diana se realizaron directamente desde la bolsa.

30 El pH del fluido recogido se ajustó a un pH entre 5,5 y 6,5 para mantener la actividad enzimática, dado que previamente se había observado que GALNS era estable a pH 6. Esto se realizó mediante una adición en bolo cronometrada de 5 % en volumen de tampón citrato sódico pH 4,0 mezclado en línea con el precedente recogido del reactor. El fluido recogido ajustado se conservó a 4 °C antes de su procesamiento aguas abajo. Los dos clones G71S que expresaban GALNS 4 y 5 tuvieron títulos promedio de aproximadamente 4,2 mg/l con una productividad específica asociada de aproximadamente 1,25 pg/célula/día.

35 Los clones G71S que expresaban GALNS, C2, C5, C6, C7, C10, C11 y C30, se cultivaron de un modo similar a gran escala y se evaluaron con respecto a la producción de la enzima GALNS activa.

EJEMPLO IV

40 Medición de la concentración y actividad de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

Se desarrollaron ensayos de inmunoabsorbencia ligados a enzima (ELISA) para medir la concentración enzimática y la actividad de GALNS procedente de los clones G71S que coexpresaban SUMF1 humano y la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana.

45 *Ensayo ELISA de actividad de captura enzimática*

50 En ensayo ELISA para actividad de captura enzimática mide la actividad de la enzima GALNS en fase sólida, después de la captura por un anticuerpo específico anti-GALNS unido a una placa ELISA.

Tampones. Tampón A (Tampón carbonato): disolver 3,09 gramos de Na_2CO_3 y 5,88 gramos de NaHCO_3 en 900 ml de H_2O desionizada (DI) y después añadir H_2O DI hasta un volumen final de 1.000 ml. Verificar que el pH se encuentra entre 9,4 y 9,6 y después esterilizar con filtro. Para revestir completamente una microplaca de 96 pocillos con 100 μl por pocillo, diluir 19 μl de anticuerpo anti-GALNS en un tubo (12 ml). Tampón B (tampón de bloqueo ELISA y tampón de dilución en serie): PBS ácido 1x, Tween-20 al 0,05 % y BSA al 2 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón B^W (Tampón de lavado): NaOAc 100 mM y Tween-20 al 0,05 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón C (Tampón sustrato): acetato de sodio 25 mM, NaCl 1 mM, BSA desalinizado 0,5 mg/ml y azida sódica 0,01 %, ajustado a pH 4,0 con ácido acético glacial. Tampón D (tampón β -galactosidasa): fosfato de sodio dibásico 300 mM, BSA 0,1 mg/ml, azida sódica al 0,01 % y Tween-20 al 0,01 %, ajustado a pH 7,2 con ácido fosfórico. Tampón E (Tampón de detención): glicina 350 mM y tampón carbonato 440 mM, ajustado a pH 10,7 con NaOH 6 M.

65 *Reactivos.* Anticuerpo anti-IgG de GALNS: los anticuerpos de conejo policlonales son proteína G purificada de suero. En D-PBS, proteína total = 3,17 mg/ml (BCA). Se conservaron alícuotas (19 μl) a -20 °C para usar una sola vez. Sustrato 4MU-Gal-6-S (sólido; 440 PM): solución de reserva 100 mM preparada en agua DI y conservada a 4 °C. β -galactosidasa (Sigma G-4155): diluir a 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón D antes de su uso.

Protocolo: unión de anticuerpo anti-GALNS a la placa: una placa ELISA Nunc MaxiSorp (Nalge/Nunc International, Fisher n.º 12-565-135) se recubre con anticuerpo anti-GALNS a una concentración de proteína final de 5 µg/ml en tampón A. Para preparar esta solución, se descongela una alícuota de 19 µl y se centrifuga brevemente (10 s) en una microcentrifuga para recoger el líquido. Se transfieren los 19 µl en 12 ml de tampón A. Se mezcla intensamente por inversión, y después se vierte en un depósito, seguido por carga en placa (100 µl por pocillo) usando una pipeta multicanal. La placa se cubre y se incuba a 4 °C durante la noche. El anticuerpo anti-GALNS no unido se retira: se lava la placa añadiendo abundante tampón B^W tres veces. Bloqueo: se bloquea la placa con tampón B (320 µl por pocillo), después se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 h. Se prepara una serie en dilución de patrón de GALNS purificado y muestras de ensayo (desconocidas) durante la etapa de bloqueo: el patrón se diluye en tampón B hasta el extremo superior del intervalo lineal del ensayo (128 ng/ml en la fila A) y después se diluye en serie (2 veces) en las filas B-G en una placa de 96 pocillos. El carril H es un control de tampón (es decir, sin enzima GALNS). En primer lugar, se preparan 500 µl de una concentración a 128 ng/ml en tampón B. Después, se diluye en serie dos veces en el tampón B (250 µl en 250 µl) hasta alcanzar 2 ng/ml. Retirada del tampón de bloqueo: después de la etapa de bloqueo, el tampón B se desecha. Se une el patrón de enzima GALNS y las muestras de ensayo a un anticuerpo anti-GALNS: se carga la placa con 100 µl/pocillo del patrón y las muestras de ensayo diluidos en serie (procesar por duplicado). Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 h. Retirada de los inhibidores GALNS: se lava la placa añadiendo una cantidad abundante de tampón B^W, tres veces. Se añade sustrato GALNS (primera reacción): se prepara suficiente solución de sustrato final para cargar 100 µl por pocillo (preparado no antes de 1 hora antes de su uso). Se diluye la solución de reserva de 4MU-Gal-6-S (100 mM) a 1 mM en tampón C. Se cargan 100 µl por pocillo. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 30 min. Se añade β-galactosidasa (segunda reacción): se añaden 50 µl de β-galactosidasa 12 µg/ml en tampón D a cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 15 min. Detención de la reacción: se añaden 100 µl de tampón E (tampón de detección) a cada pocillo para ionizar 4 MU liberado. Transferencia a la fluoroplate: se transfieren (8 pocillos a la vez) 200 µl de los 250 µl de cada pocillo de la placa ELISA a una placa de microtitulación de fondo plano no tratada negra (Fluoroplate, Costar n.º 3915). Lectura de la fluorescencia: se lee la placa en un lector de placas Gemini (Molecular Devices Corporation) usando el programa SOFTmax PRO (366 nm de excitación, 446 nm de emisión, 435 nm de límite).

ELISA de GALNS

El ELISA de GALNS mide la concentración de la enzima GALNS en medio acondicionado de cultivo celular u otras muestras del proceso usando un inmunoensayo de tipo sándwich.

Tampones. Tampón A (Tampón Carbonato): disolver 3,09 gramos de Na₂CO₃ y 5,88 gramos de NaHCO₃ en 900 ml de H₂O desionizada (DI) y después añadir H₂O DI a un volumen final de 1000 ml. Comprobar que el pH está entre 9,4 y 9,6 y después esterilizar con filtro. Para recubrir completamente una microplaca de 96 pocillos con 100 µl por pocillo, diluir 19 µl de anticuerpo anti-GALNS en un tubo (12 ml). Tampón B (Tampón de Bloqueo ELISA y Tampón de Dilución en Serie): PBS ácido 1x, Tween-20 0,05 % y BSA al 2 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón B^W (Tampón de Lavado): NaOAc 100 mM y Tween-20 0,05 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón F (Tampón de Detención): H₂SO₄ 2 N: en 600 µl en total, añadir 100 ml de H₂SO₄ 12 N y 500 ml de agua MilliQ.

Reactivos. Anticuerpo anti IgG GALNS: los anticuerpos policlonales de conejo son Proteína G purificada de suero. En D-PBS, proteína total = 3,17 mg/ml (BCA). Las alícuotas (19 µl) se conservan a -20 °C para usarse una sola vez. Anticuerpo de detección conjugado con HRP (RIVAH): el anticuerpo conjugado final se diluye 1:100 en D-PBS/BSA al 1 % y se conserva en alícuotas de 120 µl a -20 °C para usar una vez. Kit de Sustrato TMB EIA (BioRad n.º 172-1067).

Protocolo. Unión de anticuerpo anti GALNS a la placa: se recubre una placa ELISA Nunc MaxiSorp (Nalge/Nunc International, Fisher n.º 12-565-135) con anticuerpo anti GALNS a una concentración final de proteína de 5 µg/ml en tampón A. Para preparar esta solución, se descongela una alícuota de 19 µl y se centrifuga brevemente (10 s) en una microcentrifuga para recoger líquido. Se transfieren los 19 µl a 12 ml de tampón A. Se mezcla intensamente por inversión y después se vierte en un depósito, seguido de la carga en placa (100 µl por pocillo) usando una pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C (incubadora de convección) durante 2 h. No se debe usar un bloque caliente. Se retira el anticuerpo anti GALNS no unido: se lava la placa añadiendo una cantidad abundante de Tampón B^W, tres veces. Bloqueo: se bloquea la placa con Tampón B (320 µl por pocillo), después se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Preparación de diluciones en serie de muestras de ensayo (desconocidas) y patrón de GALNS purificadas durante la etapa de bloqueo: el patrón se diluye en Tampón B hasta el extremo superior del intervalo lineal del ensayo (40 ng/ml en la Fila A) y después se diluye en serie (2 veces) en las filas B-G en una placa de 96 pocillos. El Carril H es control de tampón (es decir, sin enzima GALNS). Primero, se preparan 500 µl de una concentración a 40 ng/ml en Tampón B. Después, se diluye en serie 2 veces en el Tampón B (250 µl en 250 µl) hasta alcanzar 0,625 ng/ml. Retirada del tampón de bloqueo: después de la etapa de bloqueo, el Tampón B se desecha. Unión de muestras de ensayo y patrón de la enzima GALNS con anticuerpo anti GALNS: se carga la placa con 100 µl/pocillo del patrón diluido en serie y las muestras de ensayo (procesar por duplicado). Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 h. Lavado: se lava la placa añadiendo una cantidad abundante de Tampón B^W, tres veces. Unión del conjugado de anticuerpo de detección: se descongela una alícuota (120 µl) de anticuerpo RIVAH y se centrifuga brevemente (10 s) en una microcentrifuga para recoger el líquido. Se diluyen los 120 µl en 11,9 ml de Tampón B y se invierte intensamente el tubo para mezclar. Se vierte en un depósito y se añaden 100 µl

por pocillo con la pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 30 min. Lavado: se lava la placa añadiendo una cantidad abundante de Tampón B^W, tres veces. Sustrato TMB: la solución de sustrato final se prepara mezclando 1,2 ml de Solución B con 10,8 ml de Solución A. Se vierte en un depósito y se añaden 100 µl por pocillo con la pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 15 min. Solución de detención: se introducen 12 ml de solución de detención de H₂SO₄ 2 N en el depósito con una pipeta y se añaden 100 µl por pocillo con la pipeta multicanal. Se golpea suavemente para mezclar. Lectura a A450: la placa se lee en el lector de placas.

Ensayo de actividad específico de GALNS

El ensayo de actividad específico de GALNS mide la actividad enzimática de GALNS en solución usando un sustrato específico de GALNS.

Tampones. Para todos los tampones se utiliza H₂O MilliQ. Tampón de Dilución (DB): para 1 l de DB, disolver 1,74 ml de ácido acético, 0,75 g de acetato sódico, 233,6 mg de NaCl, 2 ml de Tween-20 al 50 % y 10 ml de azida sódica al 1 % en H₂O MilliQ y ajustar el pH a 4,0 +/- 0,5 con NaOH 0,1 M si el pH es menor de 3,95 y con ácido acético 0,1 M si el pH es mayor de 4,05. Las concentraciones finales son: ácido acético 19,5 mM, acetato sódico 5,5 mM, NaCl 1 mM, Tween-20 al 0,1 % y azida sódica al 0,01 %. Tampón Fosfato (PB): para 1 l de PB, disolver 13,9 g de NaH₂PO₄-H₂O y 55 g de NaHPO₄-7H₂O en H₂O MilliQ y ajustar el pH a 7,2. La concentración final es NaPi 300 mM. Tampón de Detención (SB): para 1 l de SB, disolver 26,2 g de glicina y 46,6 g de carbonato sódico en H₂O MilliQ, y ajustar el pH a 10,6 con NaOH. Tampón de Ensayo (AB): diluir solución de reserva 4MU-Gal-6S 1:50 en DB (final 2 mM). Tampón de β-galactosidasa (βGB): 25 µg/ml de β-galactosidasa en NaPi 300 mM, pH 7,2.

Reactivos. 4MU-Gal-6S: 100 mM en H₂O (Toronto Research Chemicals Cat. n.º M334480). β-Galactosidasa: Sigma G-4155. 4-metilumbeliferona (patrón 4MU): Sigma M-1381 (solución de reserva 10 mM en DMSO).

Protocolo. Se realizan diluciones en serie de la enzima GALNS. Para GALNS purificada y formulada (~1,5 mg/ml), se diluyen muestras 1:10.000 en tubos de microcentrífuga de adhesión a baja concentración de proteína (USA Scientific Cat n.º 1415-2600) que contiene DB, antes de realizar diluciones en serie 1:1. Se ponen 100 µl de DB en una placa de 96 pocillos de unión de proteína a baja concentración. En la primera fila, se pipetea 100 µl de muestra GALNS. Después, se diluye en serie (1:1) la placa (A-G en placas de 96 pocillos). No se añaden muestras al pocillo H (control). El intervalo lineal de este ensayo es 1-75 ng/ml. Se usa el mismo procedimiento para la preparación de la curva patrón de 4MU. Se diluye solución de reserva de 4MU 10 mM en DMSO 1:100 en DB. La curva patrón de 4MU se comienza añadiendo 50 µl de 4MU 50 µM en el primer pocillo y después se diluye en serie. Se añaden 50 µl del sustrato diluido en AB (4-MU-Galactosa-6S 2 mM en DB) a una placa fluorescente de 96 pocillos. Se preincuba el sustrato durante 10 min a 37 °C. Se añaden 50 µl de las diluciones en serie de 100 µl de patrones de GALNS y 4MU a los 50 µl de sustrato en AB. Se incuba a 37 °C durante 30 min (esta primera reacción retira el sulfato del sustrato), se inactiva la primera reacción y se comienza la segunda reacción añadiendo 50 µl de β-galactosidasa (se diluye la solución de reserva de β-galactosidasa a 25 µg/ml en βGB). El fosfato inhibe la GALNS y el aumento del pH también detiene la reacción de GALNS. El pH resultante es ahora el intervalo de pH óptimo de la β-galactosidasa. Se incuba esta segunda reacción durante 15 min a 37 °C. Se ioniza el 4MU liberado añadiendo 100 µl de SB. Se lee Ex355 Em460 en un lector de placa fluorescente de 96 pocillos. Cálculos de la actividad enzimática (a 37 °C en tampón pH 4,0): 1 unidad = µmol de 4MU liberado/min; actividad = µmol de 4MU/min/ml; actividad específica = µmol de 4MU/min/mg. Cálculo de la concentración de proteína: utilizar el coeficiente de extinción de GALNS (1 µg/ml = 1,708 Unidades de Absorbancia a 280 nm).

EJEMPLO V

Purificación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

El objetivo fue obtener una gran cantidad de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante. Células G71 transfectadas de manera estable que coexpresan SUMF1 humano y GALNS humana se cultivaron en condiciones de cultivo en un biorreactor y la enzima GALNS activa se purificó del medio cultivo.

Cromatografía líquida. Aparato. Sistema Explorer 900 de Amersham Pharmacia Biotech AKTA, utilizando el programa informático Unicorn control.

Métodos analíticos de proteína. Se siguieron procedimientos estándar para SDS-PAGE, tinción con Azul de Coomassie (B101-02-COOM), transferencia de Western y ensayos de proteína Bradford. Los procesos de purificación se evaluaron por rendimiento de actividad y la pureza del producto GALNS se evaluó visualmente mediante SDS-PAGE. La presencia de impurezas procesadas se detectó mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti GALNS. La concentración de proteína se midió usando un ensayo de proteína Bradford. La concentración de la proteína GALNS purificada final se midió midiendo la A280 usando un coeficiente de extinción de 1,708.

Resinas de Cromatografía. Sefarosa 6 FF Azul (GE Healthcare, lote n.º 306346) y Fractogel SE Hi-Cap (Merck KgaA, FC040894449).

Determinaciones de la actividad enzimática de GALNS. La actividad específica de GALNS se determinó usando un sustrato fluorescente pequeño, 4-metilumbeliferil-6-S-GAL (4-MU-6-S-GAL). El ensayo de actividad específica de GALNS implica una reacción de dos etapas, en la que es necesaria la adición de la β -galactosidasa después de la incubación de GALNS con el sustrato durante un determinado tiempo para liberar la etiqueta fluorescente. Las mediciones se realizan usando un lector de placa fluorescente.

Se equilibró una columna de desalinización 10DG (Bio-RAD) con tampón de equilibrado (EQB, NaOAc 50 mM, NaCl 10 mM, pH 5,8). Para todos los tampones se utilizó H₂O MilliQ. Se cargaron tres (3) ml de GALNS purificada (0,5-2 mg/ml) en la columna de desalinización, se eluyó y se recogió en alícuotas de 4 ml en tubos de ensayo distintos usando EQB. La concentración de proteína se calculó usando el coeficiente de extinción de GALNS (1 mg/ml = 1,708 Unidades de Absorbancia a 280 nm).

Las muestras de GALNS desalinizadas se diluyeron en serie (1:1) en tampón de dilución (DB, NaOAc 50 mM, NaCl 1 mM, pH 4,0 + BSA 0,5 mg/ml). La solución de reserva de BSA se desalinizó antes del uso cargando solución de reserva de BSA 50 mg/ml (no más de VC 5 %) sobre una columna G25 previamente equilibrada con H₂O milliQ. Se pipetearon 100 μ l de la muestra de GALNS desalinizada en la primera fila de una placa de 96 pocillos de unión a baja concentración de proteína, y las muestras de GALNS diluidas en serie se introdujeron en la placa a través de una pipeta (filas A-G en placas de 96 pocillos). Se pipetearon 100 μ l de DB en el último pocillo (H). El extremo superior del intervalo lineal de este ensayo es de 200 ng/ml, y el intervalo lineal es 3-200 ng/ml. Se realizó el mismo procedimiento para preparar la curva patrón con 4-metilumbeliferona (4 MU) (Sigma M-1381, solución de reserva 10 mM en DMSO). Se transfirieron 50 μ l de las diluciones en serie 100 μ l de GALNS y 4MU a una nueva placa fluorescente de 96 pocillos (placa de fondo negro). Se añadieron 50 μ l de 4MU-Galactosa-6S 2 mM (en H₂O milliQ) a las muestras a ensayar, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Esta primera reacción se inactivó, y la segunda reacción se inició añadiendo 50 μ l de β -galactosidasa (Sigma G-4155, solución de reserva diluida a 12 μ g/ml en NaPi 300 mM, pH 7,2), y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. El 4MU liberado se ionizó añadiendo 100 μ l de tampón de detención (Glicina/Carbonato, pH 10,6). Las placas se leyeron en un lector de placas fluorescente de 96 pocillos (excitación 355 nm, emisión 460 nm). 1 Unidad se define como 1 μ mol de 4MU liberado/min, la actividad enzimática se da en μ moles 4MU/min/ml y la actividad específica se da en μ moles 4MU/min/mg, todo a 37 °C en tampón a pH 4,0.

Primer proceso de purificación. Un primer proceso de purificación incluyó una etapa de ultrafiltración (UF) seguida de un proceso de purificación de 2 columnas.

1. Filtración Recogida (HF): el material del biorreactor se filtró de forma estéril en un filtro de 0,2 μ m.
2. Ultrafiltración (UF): el material del biorreactor se concentró 10-20X por ultrafiltración a través de una membrana Sartocoon de 30 kDa.
3. Ajustar el pH a 4,5: el material de biorreactor concentrado (UF (20X)) se ajustó a pH 4,5 con tampón de ajuste de pH (NaOAc 1,75 M, pH 4,0) a temperatura ambiente y se filtró de forma estéril antes de cargar en una columna de Sefarosa Azul.
4. Sefarosa 6 Fast Flow (FF) Azul: el UF ajustado a pH 4,5 (20X) se cargó en una columna de Sefarosa Azul y la proteína GALNS se eluyó como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 9A.

Tabla 1: cromatografía Sefarosa 6 Fast Flow Azul

Etapa	VC*	Tampón
Equilibrado	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 4,5
Carga		producto UF, ajustado a pH 4,5, filtrado
Lavado 1	4	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 4,5
Lavado 2	8	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 6,0
Elución	8	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 100 mM, pH 7,0
Separación	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 1 mM, pH 7,0
Higienización	4	NaOH 0,1 N, 0,5 horas
Regeneración	5	H ₂ O
Conservación	3	ETOH al 20 %
*VC: volumen de columna. Caudal = 92 cm h ⁻¹		

5. Fractogel SE Hi-Cap: el eluato de la columna de Sefarosa Azul se ajustó a pH 4,3 y se cargó en una columna Fractogel SE Hi-Cap y la proteína GALNS se eluyó como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 9B.

Tabla 2: cromatografía Fractogel SE Hi-Cap

Etapa	VC*	Tampón
Equilibrado	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 4,3
Carga		eluato de Sefarosa Azul ajustado a pH 4,3 y diluido a 1:1 con agua MQ
Lavado 1	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 5,0
Lavado 2	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 5,5
Elución	20	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50-350 mM, gradiente, pH 5,5
Regeneración 1	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 500 mM, pH 5,5
Regeneración 2	5	acetato 20 mM/fosfato, NaCl 50 mM, pH 4,3
Higienización	5	NaOH 0,1 N, 0,5 horas
Regeneración 3	4	H ₂ O
Conservación	3	ETOH al 20 %

*VC: volumen de columna. Caudal = 150 cm h⁻¹

5 La proteína GALNS en el eluato se recogió por fraccionamiento, se descartó el pico de preelución y la cola de postelución. 6. UF/HF final: el eluato de la columna Fractogel SE Hi-CAP se concentró por ultrafiltración y se filtró de forma estéril como se ha descrito anteriormente.

10 **Formulación.** La proteína GALNS purificada se formuló en NaOAc 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, Tween-80 0,005 %, pH 5,5.

15 **Estudios de Estabilidad.** La estabilidad de la GALNS purificada formulada final se supervisó a 4 °C y -70 °C en función del tiempo conservando pequeñas alícuotas de las muestras de GALNS a las temperaturas respectivas. A determinados momentos, las alícuotas de las muestras congeladas se descongelaron rápidamente en un baño con agua a 37 °C antes de las mediciones de actividad. La Figura 8 muestra que la GALNS purificada era estable a 4 °C y a -70 °C durante un periodo de hasta al menos 79 días en el tampón de formulación.

20 **Resultados del Primer Proceso de Purificación.** La Tabla 3 muestra los rendimientos de purificación para tres preparaciones de la proteína GALNS producida a partir del clon 4 de G71S en un biorreactor de cultivo en suspensión. La pureza se estimó visualmente por SDS-PAGE y fue de aproximadamente 95 % en todos los casos.

Tabla 3: rendimientos de purificación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana del clon 4 de G71S del reactor WAVE

Etapas	Rendimiento			Promedio	Desviación Típica
	Prep 1	Prep 2	Prep 3		
UF	N/A	100	100	100	0
Sefarosa 6 FF Azul	93	103	101	99	5,3
SE Hi-Cap	90	87	90	89	1,7

25 La Figura 9 muestra una SDS-PAGE de la proteína GALNS separada por (A) cromatografía Sefarosa 6 Fast Flow Azul seguida por (B) cromatografía Fractogel SE Hi-CAP. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie (izquierda) o con anticuerpo anti GALNS (derecha). Para las transferencias de Western, el anticuerpo de conejo anti GALNS se diluyó a 1:5000, y el anticuerpo secundario era un anticuerpo de conejo anti fosfatasa alcalina. La proteína GALNS tenía un peso molecular aparente de ~55-60 kDa en SDS-PAGE, coherente con el tamaño esperado de la forma preprocesada (precursora) secretada de la enzima que carece del péptido señal de 26 restos de aminoácido, y que también carece de la escisión después de la posición 325.

35 **Caracterización del Extremo N.** El extremo N de la proteína GALNS purificada se determinó por LC/MS. La secuencia N terminal fue APQPPN, que corresponde al extremo N previsto de la forma secretada de GALNS que carece del péptido señal de 26 restos de aminoácido (en comparación con las secuencias polipeptídicas de GALNS

humanas en la Figura 4 y Figura 5).

Segundo proceso de purificación. Un segundo proceso de purificación incluyó una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) seguida de un proceso de purificación en 3 columnas.

1. Ultrafiltración (UF/DF): el material del biorreactor se concentró 20X por ultrafiltración/diafiltración a través de una membrana Sartocoon de 30 kDa a pH 5,5.
2. Ajuste del pH a 4,5: el material del biorreactor concentrado (UF/DF (20X)) se ajustó a pH 4,5 con tampón de ajuste del pH (NaOAc 1,75 M, pH 4,0) a temperatura ambiente y se filtró de forma estéril antes de cargar en una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap.
3. Fractogel EMD SE Hi-Cap: el UF/DF (20X) ajustado a pH 4,5 se cargó en una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 y acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0 y la proteína GALNS se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 140 mM, pH 5,0.
5. Sefarosa FF quelante de Zn: el eluato de la columna Fractogel EMD SE Hi-Cap se ajustó a NaCl 500 mM, pH 7,0 y se cargó en una columna Sefarosa FF quelante de Zn (Zn-IMAC), se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 10 mM, pH 7,0, y la proteína GALNS se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 90 mM, pH 7,0.
6. Ajuste del pH a 3,5: el eluato de la columna Sefarosa FF quelante de Zn que contenía la proteína GALNS se ajustó a pH 3,5 para una inactivación de virus a pH bajo y después se ajustó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0.
7. ToyoPearl Butyl 650 M: el eluato ajustado a pH bajo de la columna Sefarosa FF quelante de Zn se cargó sobre una columna ToyoPearl Butyl 650 M, se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0 y la proteína GALNS se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 0,7 M, pH 5,0.
8. UF/HF final: el eluato del eluato de la ToyoPearl Butyl 650 M se ultrafiltró y diafiltró en acetato 20 mM, fosfato 1 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5.

Formulación. La proteína GALNS purificada se formuló en NaOAc/HOAc 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 5,5.

Resultados del Segundo Proceso de Purificación. La Tabla 4 muestra la recuperación de la proteína GALNS producida a partir del clon C2 de G71S en un biorreactor de cultivo en suspensión usando el segundo proceso de purificación. La pureza de la enzima GALNS formulada (es decir, formas precursora y madura o procesadas conjuntamente) era de aproximadamente 98 %, determinado por RP-HPLC de C3. El porcentaje de la forma precursora de la enzima GALNS fue de aproximadamente 85 % determinado por electroforesis capilar en gel con SDS.

Tabla 4: recuperación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana para el clon C2 de G71S

Etapa del Proceso	Recuperación (%)
Ajuste de pH	96
Columna Fractogel SE Hi-Cap	98
Columna Zn-IMAC	89
Inactivación de Virus a pH Bajo	89
Columna ToyoPearl Butyl 650 M	99
Formulación	99
Total	70

La Figura 10 muestra una SDS-PAGE de la enzima GALNS separada por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), cromatografía Fractogel SE Hi-CAP, cromatografía Sefarosa FF quelante de Zn y cromatografía ToyoPearl Butyl 650 M. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie (lado izquierdo superior), anticuerpo anti GALNS (lado derecho superior), proteínas anti Catepsina L (lado izquierdo inferior) y anti CHO (CHOP, lado derecho inferior). Para las transferencias de Western, el anticuerpo policlonal de conejo anti GALNS se diluyó a 1:5000 y el anticuerpo secundario era un conjugado anti conejo AP; el anticuerpo policlonal de cabra anti Catepsina L se diluyó a 1:1000 y el anticuerpo secundario era un conjugado anti cabra HRP; y el anticuerpo policlonal de conejo anti CHOP se diluyó

a 1:1000 y el anticuerpo secundario era un conjugado anti conejo HRP. La enzima GALNS precursora tenía un peso molecular aparente de ~55-60 kDa en SDS-PAGE y las formas madura o procesada de la enzima GALNS tenían pesos moleculares aparentes de ~39 kDa y ~19 kDa en SDS-PAGE.

5 *Resumen del Primer Proceso de Purificación.* La enzima GALNS se purificó usando un tren de purificación que se había modificado a partir de un tren estándar (véase la Tabla 5). El material recogido del biorreactor se filtró de forma estéril en un filtro de 0,2 µm y se mantuvo a 4 °C antes de cargar sobre la columna de captura de Azul-Sefarosa. El material del biorreactor filtrado se cargó directamente o se concentró hasta 15X por ultrafiltración. La modificación del tren de purificación fue necesaria porque las etapas de purificación aguas abajo, la cromatografía de SP Sefarosa seguida por la cromatografía de Phenil Sefarosa, no produjeron GALNS suficientemente pura. Usando la cromatografía SE Hi-Cap como reemplazo para las dos columnas de purificación aguas abajo se obtuvo un proceso de purificación en 2 columnas, mejorando significativamente la pureza del material final y la recuperación de GALNS total aumentó significativamente de ~22 % a ~80 %. La pureza de la enzima GALNS (que consistía esencialmente en la forma precursora, véase la Figura 9), determinada por cromatografía C4-RP, se calculó a groso modo a > 95 % y la enzima GALNS purificada permaneció estable en tampón de formulación durante más de 79 días tanto a 4 °C como a -70 °C.

Tabla 5: primer tren de purificación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

Etapas	Proceso Normal	Proceso Modificado
1	HF (1X)	HF (1X)
2*	UF (5X)	UF (15X)
3	Ajuste a pH 4,5	Ajuste a pH 4,5
4	Sefarosa 6 FF Azul	Sefarosa 6 FF Azul
5	Sefarosa SP	SE Hi-Cap
6	Fenil Sefarosa Hi-Sub	UF/DF Final
7	UF/DF Final	
*Esta etapa es opcional.		

20 *Resumen del Segundo Proceso de Purificación.* La enzima GALNS también se purificó usando un segundo tren de purificación (véase la Tabla 6). La recuperación de GALNS total fue de aproximadamente un 70 % y se estimó que la pureza de la enzima GALNS (incluyendo tanto las formas precursora y madura o procesadas, véase la Figura 10), determinada por cromatografía C4-RP, a groso modo, era de aproximadamente 97 %.

25 Tabla 6: segundo tren de purificación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

Etapas	Proceso
1	HF (1X)
2	UF/DF (20X)
3	Ajuste a pH 4,5
4	SE Hi-Cap
5	Sefarosa quelante Zn
6	Ajuste a pH 4,5
7	ToyoPearl Butyl 650 M
8	UF/DF Final

30 Este ensayo indica que los protocolos descritos anteriormente para preparar las enzimas sulfatasa lisosomales recombinantes proporcionan un método eficaz para la producción de grandes cantidades de enzima altamente purificada, en particular la forma previamente procesada (precursora) secretada de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana.

Ejemplo VI

Purificación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana con acortamiento mínimo

5 El control de la digestión proteolítica de enzimas recombinantes es un asunto a tener en cuenta en la producción y formulación de agentes terapéuticos basados en proteínas. El objetivo fue obtener una gran cantidad de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante en forma previamente procesada (precursora) secretada. Se desarrolló un proceso de producción que permitiría la producción a gran escala de GALNS humana con acortamiento mínimo (*minimal clipping*) por proteasas, en particular, catepsina L.

10 Como se usa en el presente documento, "acortamiento mínimo" significa que en las formulaciones purificadas finales la GALNS está intacta en al menos un 98 %, al menos un 98,5 %, al menos un 99 % o al menos un 99,5 %, según la SDS-PAGE en condiciones reductoras seguida por tinción con Azul de Coomassie o electroforesis capilar en gel con SDS (SDS-CGE).

15 Durante el desarrollo de un proceso de producción para la fabricación a gran escala de GALNS, se descubrió que la forma precursora secretada de ~55 kDa de la enzima era susceptible a la degradación proteolítica por proteasas, en particular catepsina L, que son activas a pH ácido. La degradación de GALNS por proteasas genera una forma madura, acortada de GALNS, que puede observarse como dos bandas a ~40 kDa y ~19 kDa en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Este acortamiento proteolítico se exacerbó con un pH bajo (es decir, 4,5 a 5,0) requerido para la etapa de captura en columna de intercambio de cationes. Este intervalo de pH proporcionó condiciones que eran favorables para la actividad de proteasas ácidas, tales como catepsinas, presentes en la recogida de cultivo celular.

25 Se realizaron cambios en los procesos de recuperación y purificación de GALNS para minimizar la presencia y/o actividad de proteasas que pueden acortar las GALNS secretadas en el medio de cultivo celular.

30 En la Figura 11 se muestran flujogramas que representan procesos ejemplares de recuperación y purificación para la fabricación a gran escala de GALNS. El proceso de la izquierda muestra el proceso de recuperación y purificación que se utiliza en el proceso de Fase I/II, similar al tren de purificación descrito anteriormente en el Ejemplo V, que da como resultado una cantidad variable de acortamiento, que varía de ~6-30 % de la cadena peptídica debido a la activación de la catepsina L, según se determina por el proceso de SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de tinción con Azul de Coomassie (véase la Figura 12, carril 3), o que varía de un 65,3 % a un 93,7 % en la forma precursora intacta de GALNS, a juzgar por la SDS-CGE (véase la Tabla 8). El método SDS-PAGE proporciona información visual, aunque más cualitativa, sobre la degradación de proteínas, mientras que el método SDS-CGE proporciona una información más cuantitativa con respecto al % de proteína intacta presente en las formulaciones purificadas finales.

40 El proceso a la derecha de la Figura 11 muestra el proceso de recuperación y purificación en el proceso en Fase III, que da como resultado un acortamiento mínimo, que varía del 98 % al 99,6 % de la forma precursora intacta de GALNS, a juzgar por el proceso de SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de tinción con Azul de Coomassie (véase la Figura 12, carril 5) o por SDS-CGE (véase la Tabla 8).

45 *Generalidades de los cambios del proceso.* Para reducir el grado y la variabilidad del acortamiento de GALNS, se tuvieron en cuenta dos factores: (i) las proteasas son significativamente menos activas a pH neutro; y (ii) las etapas de cromatografía tanto de intercambio catiónico como de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) separan las proteasas de GALNS. El proceso de la Fase III (véase la Figura 11, a la derecha) utiliza estos factores y ayuda a reducir el acortamiento de GALNS durante el procedimiento de purificación. Esto se consiguió cambiando el orden de las dos primeras etapas de columna, con captura en la columna Zn-IMAC a pH 6,5 a 7,0. El cambio de las dos primeras columnas también hizo que fuera conveniente recoger y guardar el cultivo celular recogido a un pH superior (es decir, pH 6,5) en comparación con el pH más ácido (es decir, pH 5,5) que se usó en el proceso de Fase I/II (véase la Figura 11 a la izquierda). La conservación del material recogido acelular a pH 6,5 reduce la posibilidad de activación de proteasas, por ejemplo, catepsinas, presentes en el fluido de cultivo celular, impidiendo o reduciendo de este modo el acortamiento de GALNS.

55 *Proceso de Fase III.* A continuación, se resumen cada una de las etapas en un proceso en Fase III ejemplar de recuperación y purificación de GALNS.

60 1. Material recogido acelular (1X). Se cultivaron células G71 transfectadas de manera estable que co-expresaban SUMF1 humano y GALNS humana en condiciones de cultivo en un biorreactor como se describe en el Ejemplo III. El material del biorreactor (es decir, fluido de cultivo celular) que contenía la GALNS se recogió a pH 6,5 y se filtró usando un tren de filtración de CUNO 30SPA02A, seguido de CUNO 90ZA08A y un filtro CUNO BioAssure de 0,2 µm.

65 2. UF/DF (20X). El fluido de cultivo celular se ultrafiltró/diafiltró (UF/DF) en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 50 mM,

pH 6,5 a una conductividad de ≤ 7 mS/cm. La etapa UF/DF se realizó usando casetes Hydrosart de Sartocoon de 30 kDa. El fluido de cultivo celular se concentró 20X. Para realizar una comparación, la etapa UF/DF del proceso en Fase I/II se realizó a pH 5,5. El pH superior en el proceso Fase III reduce la posibilidad de acortamiento de GALNS por proteasas presentes en el material recogido acelular.

5 3. Filtro de carbón vegetal. El material UF/DF (20X) se filtró a través de un Carbón Activado Zeta Plus R55 (Z1274) y después se filtró de forma estéril usando un filtro de 0,2 μ m antes de guardar a 2-8 °C. El filtro de carbón vegetal redujo significativamente la presión después de cargar la columna Zn-IMAC posterior.

10 4. Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). Una columna de cromatografía de afinidad con metales Zn inmovilizados (Zn-IMAC) se equilibró en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0 y se cargó a una conductividad de $\sim 55 \pm 5$ mS/cm con el material UF/DF (20X) filtrado en carbón vegetal a pH $7,0 \pm 0,1$ mediante la adición de tampón fosfato 50 mM, pH 9,2 que contenía NaCl 2,5 M. La columna cargada se lavó con fosfato/acetato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0, seguido de fosfato/acetato 10 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0 (tampón A). La GALNS se eluyó de la columna con una mezcla de tampón a 70 % y tampón B 30 % (fosfato/acetato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 300 mM, pH 7,0).

15 5. Filtro Mustang Q. El eluato de la columna Zn-IMAC se ajustó a una conductividad de $\sim 6,0 \pm 0,5$ mS/cm a pH 7,0, y se cargó en un filtro Mustang Q para retirar los virus.

20 6. Ajuste del pH y filtración. El filtrado de Mustang Q se ajustó a pH $4,5 \pm 0,1$, se filtró usando un filtro CUNO 60ZA seguido de un filtro en línea de 0,2 μ m y después se cargó en una columna de intercambio catiónico.

25 7. Cromatografía de intercambio catiónico. Una columna de intercambio catiónico Fractogel SE HiCap se equilibró en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5, y se cargó con el filtrado Mustang Q filtrado ajustado a pH $4,5 \pm 0,1$ a una conductividad de < 7 mS/cm. La columna cargada se lavó con fosfato/acetato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5, seguido por una mezcla al 80 %:20 % de fosfato/acetato 10 mM, pH 5,0 (tampón A) y fosfato/acetato 10 mM, NaCl 250 mM, pH 5,0 (tampón B). La GALNS se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 20 a 75 % de tampón B en 80 % a 25 % de tampón A (es decir, NaCl de 50 a 190 mM).

30 8. Mantenimiento de pH bajo para inactivación de virus. El eluato de Fractogel SE HiCap se acidificó a pH $3,5 \pm 0,1$ para la inactivación de virus por adición de tampón citrato 0,2 M, pH 3,4, se mantuvo al pH bajo durante ~ 1 hora, se reajustó a pH $5,0 \pm 0,1$ por adición de tampón citrato 0,2 M, pH 6,0, y después se cargó en una columna de pulido cromatográfica de interacción hidrófoba (HIC).

35 9. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Una columna ToyoPearl Butyl 650M HIC se equilibró en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0 y se cargó con el eluato Fractogel SE HiCap viral inactivado de pH bajo ajustado a NaCl 2 M, pH 5,0. La columna cargada se lavó con fosfato/acetato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0 (tampón A). La GALNS se eluyó de la columna con una mezcla de tampón A 35 % y tampón B 65 % (fosfato/acetato 10 mM, pH 5,0).

40 10. Intercambio de tampón y ajuste de rhGALNS a 3 mg/ml. El eluato de ToyoPearl Butyl 650M HIC se cambió de tampón en acetato 20 mM, fosfato 50 mM, arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (v/v), pH 5,4 y después se ajustó a una concentración final de GALNS de 3 mg/ml en el mismo tampón.

45 11. Retirada de virus y ADN por filtración. El eluato de ToyoPearl Butyl 650M HIC cambiado de tampón se filtró para retirar cualquier virus y ADN residual usando un filtro de virus (DV20) y un filtro de ADN (Mustang Q).

50 12. Adición de PS20 al 0,01 %. El eluato de ToyoPearl Butyl 650M HIC con tampón cambiado con virus y ADN filtrado se ajustó a polisorbato 20 (PS20 o Tween-20) 0,01 % (v/v).

13. Conservación en BDS a 2-8 °C o congelado. La formulación final de GALNS purificada, es decir, la Sustancia Farmacológica en Bruto (BDS) se conservó a 2-8 °C o se congeló.

55 **Resultados.** Como se muestra en los resultados de SDS-PAGE (véase la Figura 12, carril 5), la masa molecular aparente de la banda principal es ~ 55 kDa, coherente con el valor esperado para el monómero de GALNS. Las bandas que migran a las masas moleculares aparentes de ~ 40 kDa y ~ 19 kDa en el lote n.º AP400802, que se generó usando el proceso de Fase I/II (carril 3), son los productos de degradación de GALNS resultantes del acortamiento proteolítico entre Q348 y G349. Este acortamiento se redujo enormemente en el lote n.º BMN110-0110-001, que se generó usando el proceso de Fase III (carril 5). Hay una banda minoritaria en ambas preparaciones que migra de manera ligeramente más lenta que el producto escindido de ~ 40 kDa.

60 **Generalidades de cambios del proceso adicionales.** Se desarrolló un proceso de Fase III modificado para tratar de solucionar ciertos problemas: (i) la formación de un precipitado en el material recogido concentrado; (ii) la pérdida de GALNS en la etapa de captura Zn-IMAC; (iii) la pérdida de GALNS en la fracción de lavado durante la etapa

65

ToyoPearl Butyl; y (iv) la presencia de altos niveles de impurezas CHOP en el eluato de la etapa de ToyoPearl Butyl.

Proceso de Fase III modificado. A continuación se resume cada una de las etapas en un proceso de Fase III ejemplar de recuperación y purificación para GALNS.

- 5 1. Material recogido acelular (1X). Se cultivaron células G71 transfectadas de manera estable que co-expresan SUMF1 humano y GALNS humana en condiciones de cultivo en un biorreactor como se describe en el Ejemplo III. El material del biorreactor (es decir, fluido de cultivo celular) que contenía la GALNS se recogió a pH 6,5 y se filtró usando un tren de filtración de DOCH Millipore, seguido de XOH C Millipore, y un filtro Millipore SHC de 0,2 μ m.
- 10 2. UF/DF (20X). El fluido de cultivo celular se ultrafiltró/diafiltró (UF/DF) en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 6,5 a una conductividad de ≤ 7 mS/cm. La etapa UF/DF se realizó usando casetes Hydrosart de Sartoclon de 30 kDa. El fluido de cultivo celular se concentró 20X.
- 15 3. Filtro de carbón vegetal. El material UF/DF (20X) se filtró a través de Carbón Activado Zeta Plus R55 (Z1274) y después se filtró de forma estéril usando un filtro de 0,2 μ m antes de conservar a 2-8 °C.
- 20 4. Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). Una columna de cromatografía de afinidad de metales Zn inmovilizados (Zn-IMAC) se aclaró con tampón acetato 50 mM, pH 5,0, se cargó con ZnSO₄ 50 mM, se aclaró con tampón acetato 50 mM, pH 5,0 y después se equilibró en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0 que contenía imidazol 5 mM. La Zn-IMAC equilibrada se cargó a una conductividad de $\sim 50 \pm 5$ mS/cm con el UF/DF filtrado con carbón vegetal (20X) a pH 7,0 \pm 0,1 mezclando en línea con tampón fosfato 50 mM, pH 9,2 \pm 0,1 que contenía NaCl 2,5 M en una proporción 75:25 (v/v) durante la carga de la columna Zn-IMAC. La columna cargada se lavó con fosfato/acetato 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0, seguido de fosfato/acetato 10 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0 (tampón A). La GALNS se eluyó de la columna con una mezcla de tampón A al 70 % y tampón B al 30 % (fosfato/acetato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 300 mM, pH 7,0).
- 25 5. Ajuste del pH y filtración. El eluato de la columna Zn-IMAC se ajustó a un pH 4,5 \pm 0,1 con acetato 1,75 M, pH 4,0 y después se filtró usando un filtro Millipore COHC. El material filtrado se mezcló en línea con fosfato/acetato 10 mM, pH 4,5 en una proporción 30:70 (v/v) durante la carga la columna de intercambio catiónico.
- 30 6. Cromatografía de intercambio catiónico. Una columna de intercambio catiónico Fractogel SE HiCap se equilibró en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5, y después se cargó con el eluato de la columna Zn-IMAC ajustado a pH 4,5 y filtrado a una conductividad de < 7 mS/cm. La columna cargada se lavó con fosfato/acetato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5, seguido de una mezcla de 80 %:20 % de fosfato/acetato 10 mM, pH 5,0 (tampón A) y fosfato/acetato 10 mM, NaCl 250 mM, pH 5,0 (tampón B). La GALNS se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 20 % a 75 % de tampón B en 80 % a 25 % de tampón A (es decir, NaCl de 50 a 190 mM).
- 35 7. Mantenimiento a pH bajo para inactivación de virus. El eluato de Fractogel SE HiCap se acidificó a pH 3,5 \pm 0,1 para la inactivación de virus por adición de tampón citrato 0,4 M, pH 3,4, se mantuvo al pH bajo durante ~ 1 hora (a una temperatura de 12-23 °C), se reajustó a pH 5,0 \pm 0,1 por adición de tampón citrato 0,4 M, pH 6,0, se mezcló con tampón fosfato/acetato 10 mM, pH 5, que contenía NaCl 5 M para conseguir una concentración final de NaCl 2 M y después se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m antes de cargar en una columna de pulido de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC).
- 40 8. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Una columna ToyoPearl Butyl 650M HIC se equilibró en fosfato/acetato 10 mM, NaCl 2 M, pH 4,4 y se cargó con el eluato del Fractogel SE HiCap inactivado de virus a pH bajo, filtrado, ajustado a NaCl 2 M, pH 4,3-4,4. La columna cargada se lavó con fosfato/acetato 10 mM, NaCl 2 M, pH 4,4, seguido de fosfato/acetato 10 mM, NaCl 2,5 M, pH 5,0 (tampón A). La GALNS se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 100 % a 32 % de tampón A en de 0 a 68 % de tampón B (fosfato/acetato 10 mM, pH 5,0) (es decir, NaCl de 2,5 a 0,8 M) seguido de una mezcla de tampón A 32 % y tampón B 68 % (es decir, NaCl 0,8 M).
- 45 9. Intercambio de tampón, retirada de ADN y virus por filtración, y ajuste de rhGALNS a 3 mg/ml. El eluato de ToyoPearl Butyl 650M HIC se cambió de tampón en acetato de sodio 20 mM, fosfato de sodio 50 mM, HCl arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (p/v), pH 5,4. El eluato de ToyoPearl Butyl 650M HIC cambiado de tampón se filtró para retirar cualquier ADN y virus residual usando un filtro de ADN (Mustang Q) y un filtro de virus (DV20). El eluato filtrado, con tampón cambiado, de ToyoPearl Butyl 650M HIC se ajustó después a una concentración final de GALNS de 3 mg/ml en el mismo tampón que el indicado anteriormente.
- 50 10. Se añadió PS20 al 0,01 %. El eluato de ToyoPearl Butyl 650M HIC cambiado de tampón, filtrado de virus y ADN, se ajustó a polisorbato 20 0,01 % (v/v) (PS20 o Tween-20).
- 55 60 65

11. Conservación de BSD a 2-8 °C o congelada. La formulación final de la GALNS purificada, es decir, la Sustancia Farmacológica en Bruto (BDS), se pasó a través de un filtro Millipak 200 de 0,2 µm en el envase de conservación final y se conservó en bolsas a 2-8 °C o se congeló.

5 *Resultados.* Después de este proceso de Fase III modificado, mejoró la unión de GALNS a las columnas Zn-IMAC y ToyoPearl Butyl y se redujeron las impurezas CHOP y el eluato de ToyoPearl Butyl. La GALNS purificada mediante este proceso de Fase III modificado es comparable en todas las propiedades ensayadas (por ejemplo, las de la Tabla 7 mostrada a continuación) a la enzima purificada por el proceso de Fase III descrito anteriormente.

10 *Caracterización de rhGALNS realizada por el proceso de recuperación y purificación en Fase III.* La GALNS purificada usando el proceso de Fase III se comparó con la enzima purificada por el proceso de Fase I/II. Los resultados de caracterización se dan en la Tabla 7. Aunque las dos preparaciones de GALNS parecían comparables en todas las propiedades ensayadas, la enzima purificada mediante el proceso de Fase III mostró un acortamiento significativamente menor en comparación con la purificada por el proceso Fase I/II.

15

Tabla 7: Comparación de GALNS purificada por los procesos de Fase I/II y fase III

Propiedad	Método de ensayo	TPB050109 (Proceso Fase III)	AP400802 (Proceso Fase I/II)
Actividad específica	Sustrato fluorogénico	10,2 U/mg	13,9 U/mg
Perfil de glucosilación	CZE	35,9 % BPM7	34,9 % BPM7
Acortamiento	SDS-CGE	98,7 % intacto	73,2 % intacto
Variantes de tamaño	SEC-HPLC	98,9 % intacto**	99,9 % intacto
Impurezas UV	RP-HPLC	99,5 % puro	99,7 % puro
CHOP*	ELISA	<33 ppm	46 ppm

*CHOP: Contaminantes de proteína de célula hospedadora de ovario de hámster chino
 **Los datos SEC-HPLC para otros lotes rhGALNS purificados de material obtenido para el mismo reactor cMFG 200 L usando el proceso de Fase III mostró >99 % de proteína intacta

20 La Tabla 8 compara el porcentaje de GALNS intacta usando el método SDS-CGE en la formulación purificada final en lotes que se prepararon usando bien el proceso de Fase I/II (65,3-93,7 %) o el proceso de Fase III (98-99,6 %). Los valores obtenidos en este caso confirman los resultados obtenidos del método SDS-PAGE y muestran que el grado de acortamiento se reduce significativamente como resultado de las modificaciones realizadas en el proceso de purificación.

25 Tabla 8: Comparación de % de GALNS intacta purificada por los procesos de Fase I/II y Fase III (mediante SDS-CGE)

GALNS, Lote n.º	Uso del proceso	% de GALNS intacta
11333P53	Fase I/II	82,7 %
11333P71	Fase I/II	85,6 %
11333P79	Fase I/II	93,7 %
11333P90	Fase I/II	82,6 %
11428P15	Fase I/II	80,1 %
NP40080	Fase I/II	65,3 %
AP400802	Fase I/II	73,6 %
AP400803	Fase I/II	78,5 %
AP400804	Fase I/II	82,9 %
P400902	Fase III	98 %
11615P56	Fase III	98,5 %
11615P71	Fase III	98,4 %
11615P78	Fase III	98,9 %
11615P81	Fase III	98,1 %
11780P15	Fase III	99,6 %

30 Estos ensayos indican que el protocolo descrito anteriormente para la preparación de enzimas sulfatasa lisosomales recombinantes con acortamiento mínimo proporciona un método eficaz para la producción de grandes cantidades de enzima altamente purificada, en particular la forma pre-procesada (precursora) secretada de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana.

Ejemplo VII

Caracterización de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada

5 Las líneas celulares G71 producen proteínas (por ejemplo, enzimas lisosomales) con niveles más altos de fosforilación con alta cantidad de manosa que las observadas en el promedio de las líneas celulares de mamífero, y un nivel correspondientemente más bajo de oligosacáridos de alto contenido en manosa no fosforilados. Una enzima sulfatasa lisosomal (por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante), que comprende un alto nivel de oligosacáridos de alto contenido en manosa bis-fosforilados, como se define en el presente documento, se compara con moléculas obtenidas en Canfield *et al.*, Patente de Estados Unidos 6.537.785, que no comprenden oligosacáridos complejos y solo presentan oligosacáridos de alto contenido en manosa.

15 Para determinar los niveles de alto contenido en manosa no fosforilada en una enzima sulfatasa lisosomal, un experto en la materia puede usar la secuenciación de exoglucosidasa de los oligosacáridos liberados ("secuenciación FACE"), para determinar con precisión los porcentajes de cadenas de oligosacárido de alto contenido en manosa no fosforiladas. En un gel de perfilado FACE de liberación de lote normal, la alta manosa no fosforilada co-migra con oligosacáridos complejos particulares (por ejemplo, oligomanosa 6 y complejo biantenarico completamente sialilado). El alto contenido en manosa no fosforilada se diferencia después de los otros oligosacáridos por secuenciación enzimática.

20 Para determinar si la enzima sulfatasa lisosomal purificada (por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante) expresada en células G71S presenta mayor fosforilación, se determinó el nivel de manosa-6-fosfato (M6P) en la enzima sulfatasa lisosomal, así como la capacidad de la enzima para unirse al receptor de M6P (MPR).

25 La enzima GALNS humana recombinante expresada en células G71S y purificada se analizó por electroforesis de hidratos de carbono con fluorescencia (FACE) y por cromatografía en una resina MPR-Sefarosa. El sistema FACE utiliza electroforesis en gel de poliacrilamida para separar, cuantificar y determinar la secuencia de oligosacáridos liberados de glucoproteínas. La intensidad relativa de la banda de oligomanosa 7 bis-fosfato (O7P) en FACE (Hague *et al.*, *Electrophoresis* 19(15): 2612-20, 1998) y el porcentaje de actividad retenido en la columna MPR (Cacia *et al.*, *Biochemistry* 37(43): 15154-61, 1998) da mediciones fiables del nivel de fosforilación por mol de proteína.

30 *Actividad específica.* La actividad específica de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante se determinó usando un sustrato fluorescente pequeño 4-metilumbeliferil-6-S-GAL (4MU-Gal-6S) a 37 °C. Usando este ensayo, la actividad específica de la GALNS purificada fue de 165 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (0,165 U/mg).

35 *Estabilidad en suero humano.* Se determinó la estabilidad en suero *ex vivo* de GALNS. El suero humano (Sigma H-4522) se filtró de forma estéril a través de un filtro PES de 0,2 μm y 4 ml del suero humano esterilizado con el filtro se pre-incubaron en un matraz de cultivo celular T-25 durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 10 % (el pH en este punto es de $7,4 \pm 0,1$). Se añadieron 0,4 ml de GALNS desalinizada, purificada (la GALNS purificada 2 mg/ml se desalinizó en PBS usando columnas Bio-RAD 10DG) al suero humano preincubado, o un control de PBS que contenía BSA 0,5 mg/l. Se extrajeron muestras de 100 μl a momentos indicados (por ejemplo, 0, 1, 3,5, 7,5 y 26 horas) y se añadieron a 900 ml de tampón de inactivación (QB, NaOAc 50 mM, pH 5,6 + NaCl 150 mM + BSA 0,5 mg/ml + Tween-80 al 0,001 %). Las muestras se conservaron a 4 °C hasta estar listas para medir la actividad enzimática de GALNS.

45 La actividad enzimática de GALNS se midió usando el ELISA de actividad de captura enzimática. Extrapolando la curva de descomposición exponencial de % de actividad de enzima GALNS residual, se estimó que la semivida en suero *ex vivo* de la GALNS purificada era de 217 horas.

50 *Absorción en sinoviocitos (condrocitos).* Se determinó la capacidad que tenían los sinoviocitos (condrocitos) para absorber la GALNS.

55 Se cultivaron condrocitos (ATCC Número CRL-1832) en medio de cultivo (F12 de Ham + FBS al 10 %) a 37 °C en CO_2 al 5 % en placas de 12 pocillos. El análisis de absorción de tres muestras requiere placas de 4 x 12 pocillos. Las muestras de GALNS purificadas y una de referencia de GALNS se diluyeron a 1 μM en acPBS/BSA (PBS ácido + BSA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A partir de las soluciones de reserva 1 μM , se prepararon curvas de dilución de absorción para muestras de GALNS y de referencia: 50,5 μl (rhASB 1 μM) en 5 ml de diluyente de ensayo de captación (UAD, DMEM + L-glutamina 2 mM + BSA 0,5 mg/ml), dando como resultado muestras de GALNS 10 nM y referencia, que se diluyeron posteriormente en serie a 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,21 y 0,16 nM mediante diluciones en serie de factor dos en UAD. El medio de cultivo de las placas de 12 pocillos de condrocitos confluyentes se aspiró, se añadieron 1 ml de UAD (control) o diluciones en serie de muestras de GALNS o de referencia a los pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una incubadora con CO_2 al 10 %. El medio de absorción se aspiró, volcando completamente cada placa, y cada pocillo se aclaró una vez con 1 ml de PBS. El PBS se aspiró y los condrocitos se desprendieron añadiendo 0,5 ml de tripsina/EDTA (tripsina 0,25 %/EDTA 0,1 % (Mediatech 25-053-CI, lote 25053025)) por pocillo.

65 Después del desprendimiento de la placa, los condrocitos se dividieron en alícuotas en tubos Eppendorf previamente

enfriados en hielo (30 tubos en total). Los condrocitos tripsinizados se enfriaron y después se sedimentaron a baja velocidad en una microcentrífuga (4000 rpm durante 3 minutos). La tripsina se aspiró por completo, el sedimento celular se aclaró con 1 ml de PBS, repitiendo las etapas de microcentrífuga y aspiración una vez. Se añadieron 200 μ l de tampón de lisis celular (CLB, acetato de sodio 50 mM, pH 5,6 + Triton X-100 al 0,1 %) a cada tubo. Los sedimentos celulares se resuspendieron mediante impulso-agitación vorticial tres veces. Después de la resuspensión, las mezclas de lisis celular se conservaron durante una noche a -80 °C, o se analizaron directamente.

Los lisados celulares se descongelaron a temperatura ambiente y se transfectaron a hielo cuando se descongelaron. Los lisados celulares se agitaron vorticialmente para resuspender cualquier material sólido visible y después se centrifugaron en la microcentrífuga a 14 Krpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble. Los sobrenadantes se transfirieron a un conjunto de tubos limpios y el sedimento se desechó. Después, el ensayo de actividad GALNS se realizó en los sobrenadantes. Normalmente se realizó una curva de dilución de siete puntos (diluciones en serie con factor dos comenzando a 10 nM y finalizando a 0,16 nM) que agrupaba la $K_{\text{absorción}}$ esperada de una forma bastante constante en ambos lados. La molaridad de las muestras de partida se calculó usando el peso molecular solo de la proteína.

La GALNS purificada tenía una K_d para la captación en sinoviocitos, basada en la unión al ligando en un solo sitio, de 4,9 nM.

Ensayo de unión en placas al receptor de manosa-6-fosfato (M6P). La capacidad de GALNS para unirse al receptor de manosa-6-fosfato (M6P) se determinó en un ensayo de unión en placas. Placas de unión alta FluoroNunc se recubrieron con receptor M6P 4 μ g/ml. Las placas recubiertas se lavaron dos veces con 250 μ l/pocillo de tampón de lavado (WB, TBS + Tween-20 al 0,05 %) y la unión inespecífica se bloqueó con 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo y dilución (BDB, tampón Pierce SuperBlock lote n.º CA46485). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Durante esta etapa de bloqueo, las muestras de GALNS purificadas (0,5 – 2 mg/ml conservadas a 4 °C durante 2 semanas) se diluyeron a 10 nM en BDB y después se diluyeron en serie en tampón de dilución (DB, NaOAc 50 mM, NaCl 1 mM, pH 4,0 + BSA 0,5 mg/ml) (250 μ l + 250 μ l) a 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 y 0,16 nM. Las placas bloqueadas se lavaron con WB como se ha indicado anteriormente y las muestras de GALNS diluidas se dispensaron en los pocillos por duplicado a 100 μ l/pocillo y se incubaron durante 1 hora a TA. Durante esta etapa de incubación, se preparó el sustrato de actividad 2 mM diluyendo 0,1 ml de la solución de reserva de 6S-galactosa-4MU 100 mM (conservada en H_2O , -20 °C) en 5 ml de DB, y se precalentó en un baño con agua a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con WB como se ha indicado anteriormente, se añadieron 100 μ l del sustrato diluido y se determinó la actividad específica de GALNS.

Usando el ensayo, la GALNS purificada tenía una K_d para la unión con el receptor de M6P, basándose en la unión en un solo sitio, de 2,4 nM.

Unión a la columna del receptor de manosa-6-fosfato (M6P). La capacidad de GALNS para unirse al receptor de manosa-6-fosfato (M6P) se determinó en un ensayo de unión a columna. La columna de receptor M6P se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. El receptor de M6P era del laboratorio de Peter Lobel, la resina de la columna era una resina activada NHS (Bio-RAD Affi-Gel 15), y el tamaño de la columna era de 0,7 ml. La columna del receptor de M6P se equilibró con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado (EQ, PBS ácido, pH 6,0 que contenía β -glicerofosfato 5 mM, Tween 20 al 0,05 %, glucosa-1-fosfato 5 mM y NaN_3 al 0,02 %) a un caudal de 0,25 ml/min. 6 μ g de GALNS purificada (por 200 μ l) se cargaron en la columna del receptor de M6P a un caudal de 0,1 ml/min. La GALNS no unida se retiró de la columna por lavado con 10 VC de EQ a un caudal de 0,25 ml/min. La GALNS unida se eluyó de la columna usando un gradiente de tampón de elución 0-100 % (EL, PBS ácido, pH 6,0 que contenía β -glicerofosfato 5 mM, Tween 20 0,005 %, manosa-6-fosfato 5 mM y NaN_3 0,02 %) (10 VC), seguido de 2 VC de EL al 100 %. La columna se re-equilibró con 3 VC de EQ.

Usando ELISA GALNS, se determinó que el porcentaje de GALNS purificada que se unía al receptor de M6P era del 56 %.

Análisis de oligosacáridos totales por electroforesis capilar (CE). Para determinar el nivel de manosa-6-fosforilación en GALNS, se determinó el perfil de hidratos de carbono ligados a N de los oligosacáridos totales de las GALNS por electroforesis capilar (CE) como se describe en Ma *et al.*, Anal. Chem. 71(22): 5185-5192, 1999. El método usó PNGasa F para escindir los oligosacáridos ligados a N de asparagina. Los oligosacáridos escindidos se aislaron y se derivatizaron con colorante fluorescente, y se aplicaron a una columna giratoria G10 para retirar el exceso de colorante. Los oligosacáridos purificados marcados con fluorescencia se separaron por electroforesis y los picos se cuantificaron posteriormente usando el programa informático MDQ-CE (32 Karat Ver. 7.0).

Usando este ensayo, las cantidades de oligosacáridos que contenían manosa 7 bis-fosforilada (BPM7), manosa 6 mono-fosforilada (MPM6) y ácido siálico para la GALNS purificada fueron de 0,58 mol/mol de enzima, 0,08 mol/mol de enzima y no detectable, respectivamente. Se estimó que el porcentaje de proteínas GALNS que contenían BPM7 era de 29 %.

Caracterización de oligosacárido bis7. Se determinó la localización de oligosacáridos de manosa 7 bis-fosforilada (BPM7) en la GALNS. El resto de asparagina (Asn) en la posición 178 se N-glucosiló con BPM7. El resto de Asn en la posición 397 no se N-glucosiló con BPM7, pero se observó que eran predominantemente azúcares de tipo oligomanosa.

Afinidad con hidroxiapatita. Se desarrolló un modelo de hueso *in vitro* para determinar si la GALNS tenía la capacidad de dirigirse a hueso. Se preparó una suspensión de hidroxiapatita de calidad HTP-DNA 4 mg/ml (Bio-RAD) y se equilibró en DBS + BSA 50 µg/ml, pH 7,4. La GALNS purificada, después de añadir BSA 50 µg/ml, se desalinizó en DBS, pH 7,4. La GALNS desalinizada, a una concentración final de aproximadamente 2 mg/ml, se diluyó en serie en DBS + BSA 50 µg/ml, pH 7,4, en una placa de 96 pocillos. Se transfirieron 50 µl de la GALNS diluida en serie a una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore n.º SGVN2210, PVDF hidrófila, baja unión a proteína, tamaño de poro 22 µm). Se añadieron 50 µl de la suspensión de hidroxiapatita a los pocillos de la placa de filtro que contenía la GALNS diluida en serie y se incubó durante 1 hora a 37 °C con una leve agitación. La placa se sometió a filtración por vacío.

Los sobrenadantes de la filtración al vacío se analizaron con respecto a la actividad enzimática de GALNS o por HPLC como se ha descrito anteriormente. La GALNS purificada tenía una Kd para hidroxiapatita de 3-4,0 µM.

La línea celular G71S que expresaba el factor 1 de modificación de sulfatasas (SUMF1) humano produce enzimas sulfatasa lisosomales con cantidades más altas de activación (es decir, conversión del resto de cisteína en el sitio activo en C_α-formilglicina (FGly)).

Para determinar si la enzima sulfatasa lisosomal recombinante purificada (por ejemplo, la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana) co-expresada con SUMF1 en células G71S mostraba una activación aumentada, se determinó la cantidad de conversión del resto de cisteína de sitio activo en FGly de la enzima sulfatasa lisosomal purificada.

Activación de GALNS. El porcentaje de activación, es decir, el porcentaje de conversión del resto de cisteína (Cys) del sitio activo en C_α-formilglicina (FGly) de la GALNS se determinó por LC/MS (TFA). El valor de TIC/1000 para Cys, FGly y Gly fue 39, 1840 y 183, respectivamente, indicando que aproximadamente el 90 % de la GALNS purificada estaba en una forma activa (es decir, FGly).

Resumen. La Tabla 9 muestra un resumen de la caracterización de la GALNS recombinante expresada en células del clon 4 de G71S. La Tabla 10 muestra un resumen de la caracterización de la GALNS recombinante expresada en células del clon C2 de G71S.

Tabla 9: Caracterización de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana producida a partir del clon 4 de G71S

Categoría del ensayo	GALNS
Actividad específica: Actividad/Antígeno por ELISA	0,165 U/mg
Actividad específica: Actividad/Proteína	7,7 U/mg
Pureza por C4-RP	> 95 % (6 lotes ensayados)
Tamaño por SEC	115 kDa (homodímero)
Estabilidad en suero a 37 °C	217 Horas
Absorción: Condrocitos	4,9 nM
Absorción: Fibroblastos	5,0 nM
Absorción: Osteoblastos	7,8 nM
Productividad	1,3 pg/célula/día
Título	4,2 mg/l
Unión en placa al receptor de M6P	2.4 nM
Unión en columna al receptor de M6P: % de unión	56 %
Contenido de M6P por CE: % de carbohidrato total	29 %
Contenido de M6P: mol M6P/mol GALNS	0,58
Contenido de ácido siálico por CE	1 %
Afinidad de hidroxiapatita	4 µM
Activación: % de FGly	90 %

Tabla 10: Caracterización de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana producida a partir del clon G71S

Categoría del ensayo	GALNS
Actividad específica: Actividad/Proteína	6,4 U/mg
Pureza por C4-RP	97 %
Tamaño por SEC	115 kDa (homodímero)
Captación: Fibroblastos	3,4 nM
Título	6,4 mg/l (4 lotes ensayados)
Unión en placa al receptor de M6P	5,7 nM
Contenido de M6P por CE: % de carbohidrato total	34,5 %
Contenido de M6P: mol M6P/mol GALNS	0,69

5 Estos resultados demuestran que la GALNS humana recombinante purificada tiene un alto nivel de activación, y altos niveles de fosforilación de manosa 6-fosfato. Por tanto, las células G71S que co-expresan SUMF1 y una enzima sulfatasa lisosomal (es decir, GALNS) producen de un modo eficaz enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada. El nivel aumentado de restos de alto contenido en manosa en dichas enzimas sulfatasa lisosomales conduce a una captación aumentada por el MPR en las células.

10 Ejemplo VII

Absorción y actividad de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante en condrocitos de Morquio *in vitro*

15 Se evaluó la captación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante por lisosomas de condrocitos de Morquio y la capacidad de GALNS para degradar queratán sulfato (QS) *in vitro*.

20 Los condrocitos de pacientes con Mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa, Síndrome de Morquio) tienen una actividad GALNS reducida y presentan acumulación lisosomal de KS. Se estableció un modelo *in vitro* de MPS IVa usando condrocitos aislados de biopsias de cresta iliaca de un paciente con MPS IVa. Sin embargo, los condrocitos primarios, se desdiferencian y pierden sus características de condrocitos en cultivo. Por lo tanto, las condiciones de cultivo se establecieron para inducir diferenciación de condrocitos *in vitro*.

25 Los condrocitos aislados de un paciente con MPS IVa, denominado MQCH, se cultivaron en perlas de alginato en presencia de IGF-1, TGF- β , transferrina, insulina y ácido ascórbico (Medio de Cultivo de Condrocitos, Lonza n.º CC-3225). El medio de cultivo se cambió dos veces por semana a lo largo de la duración de los experimentos, de 6 a 15 semanas. Las condiciones de estos cultivos indujeron la expresión del fenotipo y la diferenciación de los condrocitos. Estas células MQCH expresaban marcadores de condrocitos, incluyendo la región determinante de sexo Y-box-9 (Sox 9), colágeno II, colágeno X, proteína de matriz oligomérica de cartílago y ARNm de agregano, según se midió por análisis RT-PCR cuantitativo usando ARN aislado de cultivos de células MQCH. Estas células MQCH cultivadas también elaboraron matriz extracelular.

35 Se realizó microscopía confocal para confirmar que las células MQCH acumulaban KS. Las células MQCH en un cultivo de 8 semanas se tripsinizaron, se sometieron a la técnica de cytospin en portaobjetos de vidrio, se fijaron en acetona y se congelaron hasta su uso. Después de descongelar, las células se rehidrataron y se tiñeron usando, como anticuerpos primarios y secundarios, un anticuerpo monoclonal anti-KS (Chemicon) y un anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con Alexa-488 (verde), respectivamente. Las células MQ-CH presentaron una tinción intracelular con puntos, coherente con la acumulación lisosomal de KS.

40 Para determinar si la GALNS humana recombinante purificada podría absorberse por células MQCH en lisosomas y degradar KS, se incubó un cultivo celular de MQCH de 6 semanas con GALNS humana recombinante 10 nM dos veces a la semana durante 9 semanas. La absorción de GALNS y la eliminación de KS se midieron mediante microscopía confocal. Los anticuerpos primarios usados fueron: (a) un anticuerpo policlonal de conejo anti-GALNS y un anticuerpo monoclonal anti-Proteína-1 de Membrana Asociada a Lisosomas (LAMP-1), o (b) un anticuerpo monoclonal anti-KS y un anticuerpo policlonal anti-LAMP-1. Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpos conjugados con Alexa-488 (verde) para detectar anti-GALNS o anticuerpos anti-KS, o anticuerpos conjugados con Alexa-555 o -594 (rojo) para detectar anticuerpos anti-LAMP-1. Las preparaciones de células MQCH se montaron en medio de montaje que contenía DAPI, que tiñe los núcleos.

50 Se observó una co-localización significativa de la enzima GALNS y KS con el marcador de lisosomas LAMP-1 en células MQCH tratadas con GALNS. Después de la exposición de MQCH a GALNS humana recombinante,

disminuyó la cantidad de KS intracelular.

La absorción de GALNS también se midió usando un ELISA de captura enzimática de GALNS y un ELISA de actividad específica de GALNS, ambos descritos en el Ejemplo IV anterior. Como control positivo se usaron condrocitos normales humanos (NHKC), que expresan GALNS. Como se muestra en las Tablas 11 y 12, las células MQCH no tratadas no tuvieron una actividad o enzima GALNS detectable, mientras que las células MQCH tratadas durante 9 semanas con GALNS 10 nM tuvieron una enzima y actividad GALNS significativa.

Tabla 11: ELISA de captura de enzima GALNS usando células MQCH

	Células MQCH	NHKC
Sin tratamiento	N.D. ^a	0,12 ^b
GALNS 10 nM durante 9 semanas	3,99	0,88
^a No detectado: ^b ng de antígeno GALNS/ μ g de proteína total		

Tabla 12: Ensayo de actividad específica de GALNS usando células MQCH

	Células MQCH	NHKC
Sin tratamiento	N.D. ^a	2,76 ^b
GALNS 10 nM durante 9 semanas	3,68	5,15
^a No detectado: ^b actividad de GALNS/ng de antígeno		

Estos resultados demuestran que la GALNS humana recombinante purificada es captada por los condrocitos de Morquio en lisosomas y pueden degradar KS lisosomal *in vitro*. Estos condrocitos de Morquio son útiles como un modelo de eficacia *in vivo* para ensayar enzimas sulfatasa lisosomales, tales como GALNS, que degradan KS.

Ejemplo IX

Actividad de enzimas lisosomales humanas recombinantes para degradar sustratos naturales en un ensayo *in vitro* basado en células

Se desarrollaron ensayos *in vitro* basados en células para medir la actividad de enzimas lisosomales humanas recombinantes, por ejemplo, enzimas sulfatasa lisosomales, para degradar sustratos naturales.

La actividad enzimática de enzimas lisosomales humanas recombinantes, por ejemplo, enzimas sulfatasa lisosomales, se mide típicamente mediante un ensayo *in vitro* acelular usando un sustrato fluorogénico artificial (véase el Ejemplo 4 en relación con GALNS). Sin embargo, la actividad enzimática medida depende del tamaño del sustrato artificial, es decir, del número de unidades de monosacárido. Además, la actividad enzimática se mide en un medio que no refleja la situación *in vivo*. Por tanto, el ensayo *in vitro* acelular no tiene en cuenta ni la capacidad de las enzimas lisosomales para escindir sustratos naturales ni su capacidad de absorberse en células diana y localizarse en lisosomas.

Se desarrolló un ensayo *in vitro* basado en células para medir la actividad de dos enzimas lisosomales humanas recombinantes, la alfa-L-iduronidasa (IDU) y la arilsulfatasa B (ARSB), para degradar sus sustratos naturales, es decir, sustratos que contenían dermatán sulfato (DS) intracelular. El DS contiene unidades de disacárido de ácido idurónico β (1,3)-N-acetilgalactosamina β (1-4) sulfatadas de forma variable.

Se cultivaron células de fibroblasto humano GM01391 deficientes en IDU o células de fibroblasto humano GM00519 deficientes en ARSB hasta la confluencia en placas de 12 pocillos, y los cultivos se mantuvieron después de la confluencia durante 3-6 semanas para permitir la acumulación de DS intracelular.

Posteriormente, las células GM00519 o GM01391 después de la confluencia se expusieron a dosis saturantes de ARSB humana recombinante (10 nM) o IDU humana recombinante (25 nM), respectivamente, durante 4-5 días. Se recogieron las células tratadas con la enzima sulfatasa lisosomal y no tratadas, se lisaron y se centrifugaron.

La actividad enzimática lisosomal en los lisados celulares se midió determinando el contenido de DS residual de las células mediante: (1) lisado de las células; (2) digestión específica de sustratos que contenían DS en disacáridos usando condroitín ABC liasa (EC 4.2.2.4) en el lisado celular; (3) marcado de disacáridos DS con un colorante fluorescente (por ejemplo, 2-amino-acridona, AMAC); (4) separación de los disacáridos DS (por ejemplo, por electroforesis de zona capilar, CZE); y (5) detección de los disacáridos DS marcados (por ejemplo, mediante fluorescencia inducida por láser, LIF). Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Zinellu *et al.*, Electrophoresis 2: 2439-2447, 2007, y Lamari *et al.*, J. Chromatogr. B 730: 129-133, 1999 (revisado en Volpi *et al.*, Electrophoresis 29: 3095-3106, 2008).

La Tabla 13 muestra el porcentaje de degradación de DS usando células GM00519 tratadas con ARSB, determinado por medición de la cantidad de disacárido que contiene N-acetilgalactosamina-4-sulfato (disacárido 4S), que es el

disacárido DS predominante. Se obtuvieron resultados similares usando células GM01391 tratadas con IDU.

Tabla 13: Agotamiento de DS por ARSB en un ensayo *in vitro* basado en células

Edad de las células (semanas)	Células GM00519 (% de degradación) ^a
3	86
4	92
5	92
6	89

^aEl porcentaje de degradación se calculó midiendo el área bajo la curva del disacárido 4S detectado en la exploración por CZE-LIF en lisados de células tratadas con ARSB en comparación con células no tratadas.

5 El ensayo anterior indicó que las células diana absorben ARSB e IDU humana recombinante que después se localizan en lisosomas, donde degradan su sustrato natural, el DS intracelular.

10 Se realizó un experimento de búsqueda de dosis para determinar la concentración a la cual IDU se vuelve limitante de la velocidad en este ensayo basado en células. Se cultivaron células GM01391 en placas de 12 pocillos. Al cabo de 4 semanas después de la confluencia, las células se expusieron a diversas concentraciones de IDU, de 0,8 nM a 25 nM, durante 6 o 26 horas. Se prepararon lisados celulares y se procesaron como se ha descrito anteriormente. Se determinó que la IDU no se volvía limitante de la velocidad por debajo de 1 nM.

15 En un segundo experimento de búsqueda de dosis, se expusieron células GM01391 a las 3 semanas después de la confluencia a diversas concentraciones de IDU, de 0,01 a 0,2 nM, durante 2 días. Se prepararon lisados celulares y se procesaron como se ha descrito anteriormente. En este experimento, se añadió una cantidad conocida de un monosacárido patrón interno, GlcNAc-6S, a los lisados celulares para controlar la recuperación durante el procesamiento. Como se muestra en la Figura 13, se observó una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato DS en las células GM01391 tratadas con IDU.

20 En un experimento de búsqueda de dosis similar, se expusieron células GM00519 a las 3 semanas después de la confluencia a diversas concentraciones de ARSB, de 0,001 a 0,06 nM, durante 5 días. Se prepararon lisados celulares y se procesaron como se ha descrito anteriormente. En este experimento se añadió una cantidad conocida de un monosacárido patrón interno, GlcNAc-6S, a los lisados celulares para controlar la recuperación durante el procesamiento. Como se muestra en la Figura 14, se observó una disminución dependiente de las dosis en la cantidad de sustrato DS en las células GM00519 tratadas con ARSB.

30 Se desarrolló un ensayo *in vitro* basado en células para medir la actividad de una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, GALNS, para degradar su sustrato natural, es decir, sustratos que contenían queratán sulfato (KS) intracelular.

35 Se cultivaron células MQCH deficientes en GALNS como se describe en el Ejemplo 8 anterior y se trataron con GALNS humana recombinante a 1 o 10 nM. Después del tratamiento, se prepararon lisados de células MQCH y se digirieron con Queratanasa II (EC 3.2.1), que degrada oligosacáridos KS más grandes en disacáridos KS. Los disacáridos KS se marcaron con AMAC, se separaron por CZE y se detectaron por LIF, como se describe anteriormente en relación con los disacáridos DS. Se añadió GlcNAc-6S, un monosacárido KS, a los lisados celulares como patrón interno para controlar la recuperación durante el procesamiento. Se midieron las cantidades de dos disacáridos KS característicos, Gal6S-GlcNAc6S y Gal-GlcNAc6S, y los datos obtenidos se corrigieron mediante la cantidad de GlcNAc-6S recuperada. La Tabla 14 muestra el porcentaje de degradación de KS usando células MQCH tratadas con GALNS, determinado midiendo la cantidad de los dos disacáridos KS característicos.

Tabla 14: Agotamiento de KS por GALNS en un ensayo *in vitro* basado en células

	Gal6S-GlcNAc6S	Gal-GlcNAc6S
GALNS 1 nM	85,7 ^a	8,5 ^b
GALNS 10 nM	88,6	81,5

^{a,b}El porcentaje de degradación se calculó midiendo el área bajo la curva de Gal6S-GlcNAc6S y Gal-GlcNAc6S detectados en la exploración CZE-LIF en lisados de células tratadas con GALNS en comparación con células MQCH no tratadas, y ajustando el área bajo la curva de GlcNAc6S de control añadido

45 El ensayo anterior indicó que las células diana absorben GALNS humana recombinante, que después se localiza en lisosomas, donde la GALNS degrada su sustrato natural, el KS intracelular.

50 En su conjunto, estos resultados demostraron que la actividad de las enzimas lisosomales humanas recombinantes, ARSB, IDU y GALNS, para degradar sus sustratos naturales puede medirse y cuantificarse en ensayos *in vitro* basados en células. Debe apreciarse que este ensayo *in vitro* basado en células puede modificarse fácilmente para medir y cuantificar la actividad de otras enzimas sulfatasa lisosomales, así como una amplia diversidad de enzimas

lisosomales recombinantes.

Ejemplo X

5 Liberación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante en tejidos específicos

Se evaluó la capacidad de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, expresada en células G71 y purificada, de liberarse en tejidos específicos afectados por, o asociados con, una deficiencia de GALNS después de su administración en ratones.

10 La distribución altamente específica del queratán sulfato proporciona el fenotipo muy característico de Mucopolisacaridosis de Tipo IVa (MPS IVA) o Síndrome de Morquio. El queratán sulfato se encuentra principalmente en el cartílago (placas de crecimiento óseo de articulaciones, la válvula cardiaca, la laringe y el septo nasal) y en la córnea, y son estos tejidos los que presentan acumulación de queratán sulfato en pacientes con MPS IVA. Por tanto, para la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), que es deficiente en los pacientes MPS IVA o con Síndrome de Morquio, es importante mostrar la liberación de la enzima GALNS en la placa de crecimiento de huesos largos, válvula cardiaca, córnea, laringe y nariz. Para observar estos tejidos específicos, que son dianas poco vascularizadas, se investigó la liberación de una GALNS fluorescente en ratones.

20 Se ensayaron dos métodos de tinción inmunohistoquímicos en ratones: (1) GALNS humana conjugada con Alexa 488 y (2) GALNS humana no conjugada. La conjugación de GALNS humana con Alexa 488 se realizó usando el kit de marcaje maleimida C₅ Fluor 488 Alexa de Molecular Probes (A-10254). La química de conjugación de maleimida dio como resultado una proporción de marcaje con respecto a proteína de 1:1.

25 Para confirmar que la etiqueta fluorescente no interfería con la absorción de GALNS, se realizó un experimento de inmunocitoquímica usando sinoviocitos cultivados (ATCC n.º CRL-1832). Se usó un ensayo de captación estándar para comparar la GALNS no conjugada con la GALNS conjugada (GALNS-A488 o GALNS-A555). Las células se incubaron con enzima GALNS durante 4 horas con una persecución posterior con α -L-iduronidasa (IDU) durante 2 horas. Los resultados mostraron que la conjugación con Alexa 488 no interfería con la absorción celular. La Figura 15 muestra la Kd estimada para GALNS, GALNS-A488 y GALNS-A555. La absorción se midió mediante ELISA antigénico del lisado celular en lugar de actividad enzimática debido al marcado inactivado de la enzima. Se determinó que los valores de Kd de las enzimas GALNS conjugada y no conjugada eran aproximadamente iguales.

35 Para determinar la estabilidad de la etiqueta fluorescente una vez que la enzima GALNS se había incorporado en la célula, se realizó inmunotinción en GALNS conjugada o no conjugada. El anticuerpo primario usado para la tinción fue un anticuerpo anti-GALNS de conejo purificado con proteína G a una concentración de 1 μ g/ml. Todas las imágenes se tomaron en un microscopio epi fluorescente de campo amplio Leica IRE2 usando el programa informático MetaMorph. Se requirió la desconvolución de los apilados de imágenes para medir la co-localización en estas imágenes debido a la presencia de luz fuera de plano. La desconvolución se realizó usando un programa informático de visualización AutoQuant/AutoDeblur usando una función de dispersión de punto teórica (algoritmo enmascarado).

45 La inmunotinción mostró un solapamiento bastante bueno con la señal que se amplificó sobre el material GALNS-A488. El aumento observado en la sensibilidad se debía al anticuerpo primario y secundario, ambos policlonales.

50 Para determinar si la enzima GALNS se dirigía al lisosoma, se realizó la inmunotinción de los sinoviocitos cultivados con LysoTracker de Molecular Probes u otra enzima que se localiza en el lisosoma. El LysoTracker parecía mostrar algún solapamiento con la enzima GALNS-488; sin embargo, la tinción no fue uniforme. Una persecución de 2 h con N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB), una enzima lisosomal, mostró alguna co-localización con GALNS.

Los experimentos anteriores mostraron que la enzima GALNS-A488 es captada por las células y se localiza en el lisosoma, y que puede usarse para determinar la biodistribución *in vivo*.

55 Se realizaron dos estudios *in vivo*. Un primer estudio piloto fue una inyección en embolada de una sola dosis (10 mg/kg) en la vena de la cola de ratones Balb/c normales, seguida de un segundo estudio con inyecciones múltiples (5) un día sí y otro no de 10 mg/kg en la vena de la cola de ratones Balb/c normales. La Tabla 15 y la Tabla 16 describen los planos experimentales para el primer y segundo estudio, respectivamente.

60 Tabla 15: Diseño experimental del primer estudio piloto

Grupo	Total	Punto de tiempo 2 h	Punto de tiempo 24 h
Control PBS	4	2	2
GALNS-A488	4	2	2
GALNS no marcada	4	2	2

Grupo	Total	Punto de tiempo 2 h	Punto de tiempo 24 h
ASB marcada	1	1	0

Tabla 16: Diseño experimental del segundo estudio

Grupo	Total	Punto de tiempo 2 h	Punto de tiempo 4 h	Punto de tiempo 8 h
Control PBS	2	1	0	1
Control PBS/Cys	4	2	0	2
GALNS-A488	9	3	3	3
GALNS no marcada	6	3	0	3
ASB marcada	3	2	0	1

En el primer estudio piloto se recogieron el corazón, el hígado y la articulación de la tibia/fémur a las 2 horas y 24 horas. En el segundo estudio, se recogieron el corazón, el riñón, el hígado y el hueso con cuádriceps y sóleo al cabo de 2 horas, 4 horas y 8 horas. Para ambos estudios, el corazón, el riñón y el hígado se fijaron por inmersión paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 4 días, se embebieron en parafina y después se seccionaron a un grosor de 7 μm . El hueso, incluyendo el músculo en el segundo estudio, se fijó por inmersión en PFA al 4 % durante 8 días, se descalcificó, se embebió en parafina y se seccionó a un grosor de 7 μm .

Se tomaron imágenes de los ratones inyectados con GALNS-A488 en un microscopio confocal de barrido láser Zeiss. Para el análisis en el primer estudio piloto, se adquirió una pila confocal por muestra para la válvula cardiaca e hígado y se usó para el análisis volumétrico. Se adquirieron dos pilas confocales/muestra para placa de crecimiento y se usaron para el análisis volumétrico. En el segundo estudio, se adquirió una pila confocal/muestra para la válvula cardiaca, riñón e hígado y se usó para el análisis volumétrico; se adquirieron dos pilas confocales/muestra para la placa de crecimiento y zona de cartílago de apoyo (zrc) y se usaron para el análisis volumétrico.

Las conclusiones de los estudios de imágenes de microscopía confocal fueron: (1) fue posible detectar GALNS fluorescente *in vivo*; (2) la señal fue específica (ausencia de efecto de fondo) y la localización fue lisosomal; (3) la presencia de GALNS se demostró en las células sinusoidales en el hígado; (5) en el corazón, la enzima GALNS estaba presente en el septo y en la aurícula, pero lo más importante es que era claramente visible a nivel de la válvula cardiaca, donde estaba más profundamente distribuida después de múltiples inyecciones; (6) en la articulación fémur/tibia, la enzima GALNS estaba presente en la parte mineralizada del hueso (epífisis), así como en la médula. GALNS estaba presente en la placa de crecimiento. Más particularmente, GALNS era abundante en los condrocitos de la zona de apoyo (o zona de cartílago de reserva), estaba presente en el inicio de la zona proliferativa, y reaparecía de manera abundante en la zona de osificación en el extremo de la placa de crecimiento. Aunque es difícil cuantificar el efecto acumulativo de inyecciones múltiples, el segundo estudio parecía presentar una distribución más amplia. La Tabla 17 muestra un resumen de los estudios de imágenes con microscopía confocal.

Tabla 17: Biodistribución de GALNS en ratones

Tejido	Localización
Hueso (Fémur)	
Región mineralizada	Sí
Médula ósea	Sí
Placa de crecimiento	Sí
Corazón	
Válvula cardiaca	Sí
Aurícula	Sí
Septo	Sí
Hígado	
Hepatocito	No
Célula sinusoidal	Sí

Para la segunda tinción, la etapa inicial fue la optimización del anticuerpo primario de GALNS. Diversos tejidos se tiñeron con diluciones de 1:100 a 1:400 con el anticuerpo anti-GALNS de conejo purificado con proteína G. Los resultados en el primer estudio piloto indicaron que una dilución de 1:100 era óptima para una alta proporción entre señal e interferencias. Este resultado se confirmó en el segundo estudio. Los portaobjetos restantes se procesaron a una dilución de anticuerpo primario de 1:100 y a una dilución de anticuerpo secundario de 1:1000.

La señal para ratones Balb/c dosificados con GALNS tuvo una señal por encima del control (es decir, ratones dosificados con PBS-Cys) cuando se tiñó con el anticuerpo anti-GALNS purificado con proteína G. Para confirmar que la enzima GALNS se localizaba en el lisosoma, las secciones se tiñeron con un anticuerpo anti-LAMP1. LAMP1

es un marcador para lisosomas. Las imágenes mostraron solapamiento entre los anticuerpos anti-LAMP1 y anti-GALNS, indicando que la enzima GALNS estaba localizada en el lisosoma.

En su conjunto, los dos estudios *in vivo* indican que la biodistribución de GALNS está relacionada con la vascularización, es decir, cuanto más vascularizados estén los tejidos más señales fluorescentes contienen. Lo que es más importante, los estudios demuestran la presencia de GALNS en los sitios de acumulación de queratán sulfato en el Síndrome de Morquio, aunque estos sitios estén poco vascularizados.

Ejemplo XI

Formulaciones de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

El objetivo fue investigar el efecto de varios excipientes, por ejemplo, tampones, agentes de isotonicidad y estabilizantes, sobre la actividad y estructura de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante en formulaciones de la invención.

La enzima GALNS se preparó como se describe en el Ejemplo V.

La enzima GALNS se caracterizó como se describe en el Ejemplo VII.

En el Ejemplo V, la enzima GALNS humana recombinante, purificada, se formuló en NaOAc/HOAc 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,005 % o 0,01 % a pH 5,5. Se observó que después de conservación en un tampón fosfato de baja concentración, se producía la desfosforilación de la enzima GALNS. Por consiguiente, la concentración del tampón fosfato se aumentó a NaH₂PO₄ 100 mM. Después de conservación en el tampón fosfato a alta concentración, no se observó desfosforilación significativa de la enzima GALNS. Sin embargo, se observaron agregados solubles de GALNS después de conservación a 5 °C, 25 °C o 40 °C, y se observaron agregados insolubles de GALNS después de conservación a 40 °C.

En un primer estudio se evaluó el efecto de la concentración estabilizadora y del pH sobre la estabilidad de GALNS recombinante. La enzima GALNS recombinante purificada se formuló en NaOAc/HOAc 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Tween-20 al 0,01 % y sacarosa al 4 % o sorbitol al 2 %. Estabilizantes ensayados: clorhidrato de arginina (HCl arginina) 15 mM o 30 mM; y NaCl 15 mM o 30 mM. pH ensayado: 5,0, 5,4 y 5,8. Se determinó que las formulaciones a pH 5,8 variaban de pH 5,8 a 6,0. Después de conservar las formulaciones de enzima durante hasta 2 meses a 5 °C, 25 °C o 40 °C, la enzima GALNS se analizó usando diversos ensayos descritos en el Ejemplo VI.

La formación de agregados solubles en las diversas formulaciones se determinó por perfil de la enzima GALNS mediante cromatografía líquida de alto rendimiento - cromatografía de exclusión por tamaño, (SEC-HPLC). La presencia de HCl arginina tanto a 15 mM como a 30 mM suprimió el crecimiento de agregados solubles determinado por SEC-HPLC (Figura 16).

La estabilidad de la actividad de la enzima GALNS en las formulaciones se midió utilizando el ensayo de actividad enzimática *in vitro*. A 5 °C, la actividad de la enzima GALNS era estable en presencia de HCl arginina o NaCl; a 25 °C, la actividad de la enzima GALNS disminuyó ligeramente en presencia de HCl Arginina o NaCl; y a 40 °C, la actividad de la enzima GALNS en formulaciones que contenían NaCl mostró la estabilidad más baja (Figura 17).

La desfosforilación de la enzima GALNS en las formulaciones se investigó midiendo el porcentaje de manosa 7 bis-fosforilada (BPM7) por electroforesis capilar (CE) después de digestión de la enzima con PNGasa F para escindir los oligosacáridos ligados a N de la asparagina. Después de 2 meses a 5 °C, 25 °C o 40 °C, la enzima GALNS en todas las formulaciones enzimáticas tenían un perfil de glucosilación en términos de % de BPM7 que era comparable al del perfil de glucosilación de un lote de referencia de GALNS que se usó en la formulación clínica de fase I (Figura 18).

La pureza de la enzima GALNS en las formulaciones se determinó por perfil de la enzima mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con fase inversa (RP-HPLC). Después de 2 meses a 5 °C o a 25 °C, ninguna de las formulaciones presentó ningún cambio de área de pico; a 40 °C, las formulaciones que contenían HCl Arginina a pH 5,0 y pH 5,4 tampoco mostraron ningún cambio en el área pico, pero las formulaciones que contenían NaCl a pH 5,0 y pH 5,4 y todas las formulaciones a pH 5,8 mostraron una disminución en el área de pico (Figura 19). En los cromatogramas RP-HPLC, se observó un margen post-pico en las formulaciones. La formulación de GALNS que contenía HCl Arginina 30 mM mostró un margen post-pico menos prominente.

Ejemplo XII

Formulaciones ejemplares de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

El siguiente ejemplo proporciona una orientación sobre los parámetros a usar para formular composiciones que comprenden N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante o fragmentos, mutantes, variantes o análogos de la misma biológicamente activos, que son útiles para el tratamiento del Síndrome de Morquio o MPS

IVa. Los parámetros usados para formular las composiciones GALNS de la invención incluyen, pero sin limitación, agentes tampón para mantener el pH, agentes de ajuste de isotonicidad, ausencia o presencia de estabilizantes, y ausencia o presencia de otros excipientes, vehículos, diluyentes y similares.

5 En el Ejemplo XI, la GALNS recombinante se formuló a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml. Una GALNS preferida se formuló a una concentración que variaba de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 5 mg/ml, y más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 1,5 mg/ml. En una realización, una formulación de la composición GALNS de la invención tenía una concentración de enzima GALNS de aproximadamente 1 +/- 0,5 mg/ml.

10 En el Ejemplo XI, la enzima GALNS recombinante se formuló en NaOAc/HOAc 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, a pH 5,0, 5,4 y 5,8. Un agente tampón preferido es NaOAc/HOAc, o su equivalente, y NaH₂PO₄ o su equivalente, variando la concentración de NaOAc/HOAc de aproximadamente 5 a 100 mM, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 mM y más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 mM, y variando la concentración de NaH₂PO₄ de aproximadamente 5 a 100 mM, preferentemente de aproximadamente 25 a 100 mM y más preferentemente de aproximadamente 25 a 75 mM. En una realización ejemplar, una formulación de la composición GALNS de la invención tiene una concentración de tampón NaOAc/HOAc de aproximadamente 20 +/- 10 mM y una concentración de tampón NaH₂PO₄ de aproximadamente 50 +/- 25 mM.

20 Un pH preferido de la formulación es de aproximadamente pH 4,5-6,5, preferentemente aproximadamente pH 5,0-6,0 y más preferentemente aproximadamente pH 5,0-5,8. En una realización, una formulación de la composición GALNS de la invención tiene un pH de aproximadamente pH 5,4 +/- 0,4.

25 En el Ejemplo XI, la enzima GALNS recombinante se formuló en HCl Arginina o NaCl 15 mM o 30 mM. Un agente estabilizante preferido es HCl Arginina o su equivalente, con una concentración que varía de aproximadamente 5 a 200 nM, preferentemente de aproximadamente 10 a 100 mM, y más preferentemente de aproximadamente 10 a 50 mM. En una realización ejemplar, una formulación de la composición GALNS de la invención tiene una concentración de HCl Arginina de aproximadamente 30 +/- 20 mM.

30 En el EJEMPLO XI, la enzima GALNS recombinante se formuló en Tween-20 al 0,01 %. Un agente estabilizante preferido es Tween-20 (también conocido como Polisorbato-20) o su equivalente, con una concentración que varía de aproximadamente 0,001 a 1,0 % (p/v), preferentemente de aproximadamente 0,005 a 0,2 % (p/v), y más preferentemente de aproximadamente 0,005 a 0,015 % (p/v). En una realización, una formulación de la composición GALNS de la invención tiene una concentración Tween-20 de aproximadamente 0,01 % +/- 0,005 % (p/v).

35 En el Ejemplo XI, la enzima GALNS recombinante se formuló en sacarosa al 4 % o sorbitol al 2 %. Un estabilizante/crioprotector/agente de tonicidad preferido es el sorbitol, o su equivalente, con una concentración que varía de aproximadamente 0,1 al 10 % (p/v), preferentemente de aproximadamente 0,5 a 5 % (p/v), y más preferentemente de aproximadamente 1,0 a 3,0 % (p/v). Una formulación ejemplar de las composiciones GALNS de la invención tiene una concentración de sorbitol de aproximadamente 2,0 % +/- 1,0 % (p/v).

40 Por consiguiente, una formulación ejemplar de las composiciones de la enzima GALNS de la invención se muestra en la Tabla 18.

45 Tabla 18: Formulaciones ejemplares de GALNS humana recombinante

Clase de ingrediente	Tipo de ingrediente	Intervalo de Concentración
Sustancia activa	GALNS humana recombinante	1,0 +/- 0,5 mg/ml
Agente Tampón	NaOAc/HOAc Acetato de Sodio, Trihidrato*	20 mM +/- 10 mM (2,72 mg/ml +/- 1,36 mg/ml) y pH 5,4 +/- 0,4
Agente tampón	NaH ₂ PO ₄ Fosfato de Sodio, Monohidrato Monobásico	50 mM +/- 25 mM (6,90 mg/ml +/- 3,45 mg/ml)
Estabilizante	HCl Arginina	30 mM +/- 20 mM (6,32 mg/ml +/- 4,11 mg/ml)
Estabilizante	Tween-20	0,01 % (p/v) +/- 0,005 % (w/v) (0,1 mg/ml +/- 0,05 mg/ml)
Estabilizante, Crioprotector y Agente de tonicidad	Sorbitol	2,0 % (p/v) +/- 1,0 % (w/v) (20 mg/ml +/- 10 mg/ml)

*el pH se ajusta por titulación con ácido acético glacial (HOAc) o con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N

Ejemplo XIII

50 Efectos de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, y de otras enzimas sulfatasas lisosomales en ratones deficientes en actividad de enzima sulfatasa lisosomal

Se evaluaron los efectos de las enzimas sulfatasas lisosomales humanas altamente fosforiladas activas de la invención, por ejemplo, la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, en ratones deficientes en actividad de enzima sulfatasa lisosomal.

- 5 La proteína GALNS humana recombinante se expresó en células G71S y se purificó. Otras enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes pueden expresarse y purificarse básicamente de acuerdo con métodos descritos en el presente documento o procedimientos conocidos en la técnica.

Se han descrito diversos modelos de ratón de deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal humana, incluyendo: Leucodistrofia metacromática (MLD) (deficiencia de arilsulfatasa A), (Hess *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14821-14826, 1996), Mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) o síndrome de Maroteaux-Lamy (deficiencia de arilsulfatasa B) (Evers *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8214-8219, 1996), Mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) (Muenzer *et al.*, Acta Paediatr. Suppl. 91(439): 98-99, 2002; Cardone *et al.*, Hum. Mol. Genet. 15: 1225-1236, 2006), Mucopolisacaridosis de tipo IIIa (MPS IIIa) o síndrome de Sanfilippo A (deficiencia de sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa) (Bhaumik *et al.*, Glycobiology 9(12): 1389-1396, 1999), Mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A (deficiencia de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa) (Tomatsu *et al.*, Hum. Mol. Genet. 12: 3349-3358, 2003), y Deficiencia de Sulfatasa Múltiple (MSD) (deficiencia de factor de modificación 1 de sulfatasas) (Settembre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 4506-4511, 2007). Ya se había descrito un modelo de ratón de Mucopolisacaridosis de tipo IIIId (MPS IIIId) o síndrome de Sanfilippo D (deficiencia de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa).

Pueden usarse modelos de ratón de deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal humana para evaluar si es factible la terapia de reemplazo enzimático (ERT) como un medio para tratar trastornos por depósito lisosomal. Por ejemplo, ratones knock-out MPS IVa (ratones $GALNS^{-/-}$; Tomatsu *et al.*, Hum. Mol. Genet. 12: 3349-3358, 2003) no tienen actividad enzimática GALNS detectable y presentan aumento de glucosaminoglucanos (GAG) en la orina, es decir, queratín sulfato y condroitín-6-sulfato, y acumulación de GAG en tejidos y órganos múltiples, por ejemplo, hígado, riñón, bazo, corazón, cerebro, médula ósea y cartilago. Sin embargo, los ratones $GALNS^{-/-}$ no presentan anomalías esqueléticas asociadas a la enfermedad humana. Se desarrolló otro modelo de ratón MPS IVa que expresaba una GALNS humana inactiva y una GALNS de ratón endógena inactiva, mutada (ratones $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$, Tomatsu *et al.*, Hum. Mol. Genet. 14: 3321-3335, 2005). En los ratones $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$, que no tenían actividad enzimática GALS detectable, aumentó la excreción de GAG urinaria, GAG se acumulaba en tejidos múltiples, incluyendo órganos viscerales, cerebro, córnea, hueso, ligamientos y médula ósea, el depósito lisosomal era notable en tejidos múltiples y el depósito óseo era evidente. Las alteraciones patológicas en ratones $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$ son diferentes de las observadas en ratones $GALNS^{-/-}$. Sin embargo, al igual que los ratones $GALNS^{-/-}$, los ratones $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$ no presentan anomalías esqueléticas asociadas a la enfermedad humana. Por tanto, los ratones $GALNS^{-/-}$ o $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$ pueden usarse para investigar el efecto de la administración de la GALNS humana recombinante sobre el aumento de GAG en orina y la acumulación de GAG en los tejidos.

40 Ratones de cuatro semanas de vida, $GALNS^{-/-}$, $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$ o de tipo silvestre recibieron inyecciones semanales intravenosas (n = al menos 6 u 8 por grupo) de diversas dosis de GALNS humana recombinante (por ejemplo, 0,1, 0,3, 1,3, 10 mg/kg) o un control con vehículo durante 16-20 semanas de vida y después se sacrificaron para su examen histológico. Se recogió la orina de los ratones y se determinó la excreción de GAG en orina, como se describe en (Tomatsu *et al.*, Hum. Mol. Genet. 12: 3349-3358, 2003). El examen patológico de diversos tejidos se realizó como se describe en (Tomatsu *et al.*, Hum. Mol. Genet. 12: 3349-3358, 2003).

Usando los ratones $GALNS^{-/-}$ o $GALNS^{tm(hC79S.mC76S)slu}$, se esperaba que la GALNS humana recombinante de la invención demostrase su capacidad para reducir: (1) la excreción de GAG urinaria; (2) la acumulación de GAG en tejidos múltiples, por ejemplo, órganos viscerales, cerebro, córnea, hueso, ligamento y médula ósea; (3) depósito lisosomal en tejidos múltiples; y (4) depósito óseo.

El efecto de la GALNS humana recombinante se investigó en un modelo de ratón de Deficiencia Múltiple de Sulfatasa (MSD) (ratones $SUMF1^{-/-}$; Settembre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 4506-4511, 2007). Dado que los ratones $SUMF1^{-/-}$ presentan frecuente mortalidad precoz en vida, las inyecciones de estos ratones con GALNS humana recombinante se inició antes de lo que se describe anteriormente para ratones $GALNS^{-/-}$.

60 Siguiendo los procedimientos conocidos en la técnica, se investigaron los efectos de otras enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes, es decir, arilsulfatasa A, arilsulfatasa B, iduronato-2-sulfatasa, sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa y N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, en modelos de ratón de MLD (ratones $ASA^{-/-}$; Hess *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14821-14826, 1996), MPS VI (ratones $As1-s^{-/-}$; Evers *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8214-8219, 1996), MPS II (ratones $ids^{v/v}$; Cardone *et al.*, Hum. Mol. Genet. 15: 1225-1236, 2006), MPS IIIa (Bhaumik *et al.*, Glycobiology 9(12):1389-1396, 1999) y MSD (ratones $SUMF1^{-/-}$; Settembre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 4506-4511, 2007).

65

Ejemplo XIV

Tratamiento de pacientes humanos que padecen Mucopolisacaridosis de Tipo IVA (o Síndrome de Morquio) u otras deficiencias de enzimas sulfatasas lisosomales, con N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante y otras enzimas sulfatasa lisosomales.

Pacientes humanos que manifiestan un fenotipo clínico de deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal, tales como pacientes diagnosticados con Mucopolisacaridosis de Tipo IVA (MPS IVa o Síndrome de Morquio), se contemplan para terapia de reemplazo enzimático con la enzima recombinante, es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana. Todos los pacientes que padecen una deficiencia enzimática sulfatasa lisosomal manifiestan algún indicio clínico de acumulación excesiva o dañina en tejido blando y visceral de material de depósito en sus lisosomas, manifestado por diversos grados de deterioro funcional o empeoramiento del estado de salud asociado a una enfermedad por depósito lisosomal particular. Todos los pacientes con MPS IVa manifiestan algún indicio clínico de deformidad ósea, baja estatura y una forma de andar anómala, y/o acumulación de glucosaminoglucano (GAG) en la sangre u orina, con diversos grados de disfunción funcional.

Preferentemente, en un paciente que padece una deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal, los niveles enzimáticos se monitorizan para confirmar la ausencia o actividad reducida de la enzima sulfatasa lisosomal en sus tejidos. Los pacientes con menos de 10 %, preferentemente menos de 5 %, más preferentemente menos de 2 %, e incluso más preferentemente menos de 1 % de la actividad enzimática lisosomal en un sujeto de otra manera normal, son candidatos adecuados para el tratamiento con la enzima sulfatasa lisosomal apropiada. Pueden recopilarse datos para determinar la actividad enzimática sulfatasa lisosomal de los pacientes antes, durante y después de la terapia.

La eficacia se determina midiendo el porcentaje de reducción en la excreción urinaria del sustrato, es decir, glucosaminoglucano (GAG) de la enzima sulfatasa lisosomal a lo largo del tiempo. Los niveles de GAG urinarios en pacientes que padecen una deficiencia de enzima sulfatasa lisosomal se comparan con niveles de excreción normales y/o con niveles de pacientes no tratados que padecen la misma deficiencia enzimática sulfatasa lisosomal y/o con niveles en el mismo paciente antes de terapia con la enzima sulfatasa lisosomal. Una reducción mayor del 25 %, preferentemente mayor del 50 %, en la excreción de GAG degradados después de terapia con la enzima sulfatasa lisosomal, es un medio válido para medir la respuesta de un individuo a la terapia.

La eficacia también puede determinarse de acuerdo con los signos y síntomas reducidos de patología asociados con la enfermedad por depósito lisosomal. La eficacia puede determinarse por biopsia tisular y examen de células y/o lisosomas para determinar el grado al cual se han reducido los GAG en los lisosomas, células o tejidos. La eficacia puede determinarse por evaluaciones funcionales, que pueden ser objetivas o subjetivas (por ejemplo, reducción del dolor o dificultad en función, aumento de la fuerza o vigor muscular, aumento del gasto cardíaco, resistencia al ejercicio, cambios en la masa corporal, peso o aspecto y similares).

Una composición farmacéutica comprende la GALNS humana recombinante, expresada en células G71S y purificada, y formulada de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Se prefiere administrar las composiciones farmacéuticas de la invención por vía intravenosa.

El diseño básico de un estudio clínico inicial para investigar el efecto de la administración de la GALNS humana recombinante en pacientes con MPS IVa, implica un estudio de seguridad/eficacia, sin ocultación, con aumento escalonado de la dosis, donde diversas dosis de enzima se administran por vía intravenosa a los pacientes a un intervalo fijo, por ejemplo y sin limitación, inyecciones semanales de la enzima.

Para pacientes con MPS IVa, la eficacia se determina midiendo, por ejemplo, la disminución de GAG en sangre u orina, que probablemente se observa al cabo de semanas de ERT, el aumento de resistencia en ensayos de función cardíaca, pulmonar y/o motora, que probablemente se observa al cabo de meses de ERT, y/o cambios esqueléticos y/o crecimiento corporal, que probablemente se observa al cabo de años de ERT.

Las mediciones de GAG en la orina son útiles para establecer un régimen de dosificación apropiado, así como para determinar la eficacia, midiendo el porcentaje de reducción de excreción de GAG en la orina a lo largo del tiempo.

Puede emplearse una serie de ensayos de resistencia, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, ensayos de recorrido (distancia recorrida en 6 o 12 minutos), de subir escaleras (escalones por minuto) y de función pulmonar/respiratoria, incluyendo función cardíaca (ECG, ecocardiograma), función pulmonar (FVC, FEV₁, flujo máximo).

Para pacientes más jóvenes que se someten a tratamiento durante periodos de tiempo prolongados, puede medirse el crecimiento (altura).

Las enfermedades por depósito lisosomal asociadas a deficiencia en actividad enzimática sulfatasa lisosomal que pueden tratarse o prevenirse usando los métodos de la presente invención son: Leucodistrofia Metacromática (MLD), Mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) o síndrome de Maroteaux-Lamy, Mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter, Mucopolisacaridosis de tipo IIIa (MPS IIIa) o síndrome de Sanfilippo A,

Mucopolisacaridosis de tipo IIIId (MPS IIIId) o síndrome de Sanfilippo D, Mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A, o Deficiencia Múltiple de Sulfatasa (MSD). Para cada enfermedad por depósito lisosomal, la enzima sulfatasa lisosomal recombinante comprendería una enzima sulfatasa lisosomal específica.

- 5 Para los métodos que implican MLD, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la arilsulfatasa A. Para los métodos que implican MPS VI, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la arilsulfatasa B. Para los métodos que implican MPS II, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es iduronato-2-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IIIA, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IID, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la N-acetilglucosamina-6-sulfatasa. Para métodos que implican MPS IVA, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. Para métodos que implican MSD, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Koppaka, *et al.*
- <120> FABRICACIÓN DE ENZIMAS N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA HUMANAS, ALTAMENTE FOSFORILADAS, ACTIVAS Y USOS DE LAS MISMAS
- 20 <130> 30610/45573A
- <150> US-61/366.714
- <151> 22-07-2010
- 25 <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
- <211> 1125
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <223> Secuencia de polinucleótidos del Factor de Modificación 1 de Sulfatasas (SUMF1) humano
- <400> 1

ES 2 616 263 T3

```

atggetgcgc ccgcactagg gctggtgtgt ggacgttgcc ctgagctggg tctcgtcctc      60
ttgctgctgc tgctctcgct gctgtgtgga ggggcagggg gccaggaggc cgggaccggt      120
gcgggcgcgg ggtcccttgc gggttcttgc ggctgcggca cgcgccagcg gcctggcgcc      180
catggcagtt cggcagccgc tcaccgatac tcgcgggagg ctaacgctcc gggccccgta      240
cccggagagc ggcaactcgc gcaactcaaag atgggtcccca tccttctgtg agtatttaca      300
atgggcacag atgatcctca gataaagcag gatggggaag cacctgcgag gagagttact      360
attgatgcct ttacatgga tgcctatgaa gtcagtaata ctgaatttga gaagtttgtg      420
aactcaactg gctatttgac agaggctgag aagtttgcg actccttgt ctttgaaggc      480
atgttgagtg agcaagtgaa gaccaatatt caacaggcag ttgcagctgc tccttctgtg      540
ttacctgtga aaggcgctaa ctggagacac ccagaagggc ctgactctac tattctgcac      600
aggccggatc atccagttct ccatgtgtcc tggaatgatg cggttgccta ctgcacttgg      660
gcaggggaagc ggctgcccac ggaagctgag tgggaataca gctgtcgagg aggcctgcat      720
aatagacttt tcccctgggg caacaaactg cagcccaaag gccagcatta tgccaacatt      780
tggcagggcg agtttccggt gaccaacact ggtgaggatg gcttccaagg aactgcgcct      840
gttgatgcct tcctcccaa tggttatggc ttatacaaca tagtggggaa cgcgatggaa      900
tggacttcag actggtggac tgttcatcat tctgttgaag aaacgcttaa cccaaaaggt      960
cccccttctg ggaaagaccg agtgaagaaa ggtggatcct acatgtgcca taggtcttat     1020
tgttacaggt atcgtgtgc tgctcggagc cagaacacac ctgatagctc tgcttccaat     1080

ctgggattcc gctgtgcagc cgaccgcctg cccaccatgg actga                          1125

```

5 <210> 2
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencia de polipéptidos del Factor de Modificación 1 de Sulfatasas (SUMF1) humano

15 <400> 2

ES 2 616 263 T3

Met Ala Ala Pro Ala Leu Gly Leu Val Cys Gly Arg Cys Pro Glu Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Cys Gly Ala Ala
 20 25 30

Gly Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly
 35 40 45

Ser Cys Gly Cys Gly Thr Pro Gln Arg Pro Gly Ala His Gly Ser Ser
 50 55 60

Ala Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val
 65 70 75 80

Pro Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala
 85 90 95

Gly Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly
 100 105 110

Glu Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala
 115 120 125

Tyr Glu Val Ser Asn Thr Glu Phe Glu Lys Phe Val Asn Ser Thr Gly
 130 135 140

Tyr Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly
 145 150 155 160

Met Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala
 165 170 175

Ala Pro Trp Trp Leu Pro Val Lys Gly Ala Asn Trp Arg His Pro Glu
 180 185 190

ES 2 616 263 T3

Gly Pro Asp Ser Thr Ile Leu His Arg Pro Asp His Pro Val Leu His
 195 200 205

Val Ser Trp Asn Asp Ala Val Ala Tyr Cys Thr Trp Ala Gly Lys Arg
 210 215 220

Leu Pro Thr Glu Ala Glu Trp Glu Tyr Ser Cys Arg Gly Gly Leu His
 225 230 235 240

Asn Arg Leu Phe Pro Trp Gly Asn Lys Leu Gln Pro Lys Gly Gln His
 245 250 255

Tyr Ala Asn Ile Trp Gln Gly Glu Phe Pro Val Thr Asn Thr Gly Glu
 260 265 270

Asp Gly Phe Gln Gly Thr Ala Pro Val Asp Ala Phe Pro Pro Asn Gly
 275 280 285

Tyr Gly Leu Tyr Asn Ile Val Gly Asn Ala Trp Glu Trp Thr Ser Asp
 290 295 300

Trp Trp Thr Val His His Ser Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Gly
 305 310 315 320

Pro Pro Ser Gly Lys Asp Arg Val Lys Lys Gly Gly Ser Tyr Met Cys
 325 330 335

His Arg Ser Tyr Cys Tyr Arg Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Ser Gln Asn
 340 345 350

Thr Pro Asp Ser Ser Ala Ser Asn Leu Gly Phe Arg Cys Ala Ala Asp
 355 360 365

Arg Leu Pro Thr Met Asp
 370

5 <210> 3
 <211> 1569
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia de polinucleótidos de N-Acetilgalactosamina-6-Sulfatasa (GALNS) humana

<400> 3

15 atggcgggcg ttgtcgcggc gacgaggtgg tggcagctgt tgctggtgct cagcgccgcg 60

ES 2 616 263 T3

```

gggatggggg cctcggggcg cccgcagccc cccaacatcc tgctcctgct catggaogac      120
atgggatggg gtgacctcgg ggtgtatgga gagccctcca gagagacccc gaatttggac      180
cggatggctg cagaagggct gcttttccca aacttctatt ctgccaaccc tctgtgctcg      240
ccatcgaggg cggcactgct cacaggacgg ctacccatcc gcaatggctt ctacaccacc      300
aacgcccatt ccagaaacgc ctacacaccg caggagattg tgggcggcat ccagactcgc      360
gagcagctcc tgccggagct tctgaagaag gccggctacg tcagcaagat tgtcggcaag      420
tggcatctgg gtcacaggcc ccagttccac cccctgaagc acggatttga tgagtggttt      480
ggatccccc aactgccactt tggaccttat gacaacaagg ccaggcccaa catccctgtg      540
tacagggact gggagatggt tggcagatat tatgaagaat ttcctattaa tctgaagacg      600
ggggaagcca acctcaccca gatctacctg caggaagccc tggacttcat taagagacag      660
gcacggcacc accccttttt cctctactgg gctgtcagcg ccacgcacgc acccgtctat      720
gcctccaaac ccttcttggg caccagtcag cgagggcggg atggagacgc cgtccgggag      780
attgatgaca gcattgggaa gatactggag ctccctcaag acctgcacgt cgcggacaac      840
accttcgtct tcttcacgtc ggacaacggc gctgcctca tttccgcccc cgaacaaggt      900
ggcagcaacg gcccttttct gtgtgggaag cagaccacgt ttgaaggagg gatgagggag      960
cctgccctcg catggtggcc agggcacgtc actgcaggcc aggtgagcca ccagctgggc     1020
agcatcatgg acctcttcac caccagcctg gcccttgcgg gcctgacgcc gccagcgcac     1080
agggccattg atggcctcaa cctcctcccc accctcctgc agggccggct gatggacagg     1140
cctatcttct attaccgtgg cgacacgctg atggcggcca ccctcgggca gcacaagget     1200
cacttctgga cctggaccaa ctccctgggag aacttcagac agggcattga tttctgcctt     1260
gggcagaacg tttcaggggt cacaactcac aatctggaag accacacgaa gctgcccttg     1320
atcttccacc tgggacggga cccaggggag aggttcccc tcagctttgc cagcgcggag     1380
taccaggagg ccctcagcag gatcacctcg gtcgtccagc agcaccagga ggccttggtc     1440
cccgcgcagc ccagctcaa cgtgtgcaac tgggcgggta tgaactgggc acctccgggc     1500
tgtgaaaagt tagggaagtg tctgacacct ccagaatcca ttccaagaa gtgcctctgg     1560
tcccactag                                     1569

```

5 <210> 4
 <211> 522
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Secuencia de polipéptidos de N-Acetilgalactosamina-6-Sulfatasa (GALNS) humana

<400> 4

ES 2 616 263 T3

Met Ala Ala Val Val Ala Ala Thr Arg Trp Trp Gln Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Ser Ala Ala Gly Met Gly Ala Ser Gly Ala Pro Gln Pro Pro Asn
20 25 30

Ile Leu Leu Leu Leu Met Asp Asp Met Gly Trp Gly Asp Leu Gly Val
35 40 45

Tyr Gly Glu Pro Ser Arg Glu Thr Pro Asn Leu Asp Arg Met Ala Ala
50 55 60

Glu Gly Leu Leu Phe Pro Asn Phe Tyr Ser Ala Asn Pro Leu Cys Ser
65 70 75 80

Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg Leu Pro Ile Arg Asn Gly
85 90 95

Phe Tyr Thr Thr Asn Ala His Ala Arg Asn Ala Tyr Thr Pro Gln Glu
100 105 110

Ile Val Gly Gly Ile Pro Asp Ser Glu Gln Leu Leu Pro Glu Leu Leu
115 120 125

Lys Lys Ala Gly Tyr Val Ser Lys Ile Val Gly Lys Trp His Leu Gly
130 135 140

His Arg Pro Gln Phe His Pro Leu Lys His Gly Phe Asp Glu Trp Phe
145 150 155 160

Gly Ser Pro Asn Cys His Phe Gly Pro Tyr Asp Asn Lys Ala Arg Pro
165 170 175

Asn Ile Pro Val Tyr Arg Asp Trp Glu Met Val Gly Arg Tyr Tyr Glu
180 185 190

Glu Phe Pro Ile Asn Leu Lys Thr Gly Glu Ala Asn Leu Thr Gln Ile
195 200 205

Tyr Leu Gln Glu Ala Leu Asp Phe Ile Lys Arg Gln Ala Arg His His
210 215 220

Pro Phe Phe Leu Tyr Trp Ala Val Asp Ala Thr His Ala Pro Val Tyr
225 230 235 240

ES 2 616 263 T3

Ala Ser Lys Pro Phe Leu Gly Thr Ser Gln Arg Gly Arg Tyr Gly Asp
 245 250 255

Ala Val Arg Glu Ile Asp Asp Ser Ile Gly Lys Ile Leu Glu Leu Leu
 260 265 270

Gln Asp Leu His Val Ala Asp Asn Thr Phe Val Phe Phe Thr Ser Asp
 275 280 285

Asn Gly Ala Ala Leu Ile Ser Ala Pro Glu Gln Gly Gly Ser Asn Gly
 290 295 300

Pro Phe Leu Cys Gly Lys Gln Thr Thr Phe Glu Gly Gly Met Arg Glu
 305 310 315 320

Pro Ala Leu Ala Trp Trp Pro Gly His Val Thr Ala Gly Gln Val Ser
 325 330 335

His Gln Leu Gly Ser Ile Met Asp Leu Phe Thr Thr Ser Leu Ala Leu
 340 345 350

Ala Gly Leu Thr Pro Pro Ser Asp Arg Ala Ile Asp Gly Leu Asn Leu
 355 360 365

Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gly Arg Leu Met Asp Arg Pro Ile Phe Tyr
 370 375 380

Tyr Arg Gly Asp Thr Leu Met Ala Ala Thr Leu Gly Gln His Lys Ala
 385 390 395 400

His Phe Trp Thr Trp Thr Asn Ser Trp Glu Asn Phe Arg Gln Gly Ile
 405 410 415

Asp Phe Cys Pro Gly Gln Asn Val Ser Gly Val Thr Thr His Asn Leu
 420 425 430

Glu Asp His Thr Lys Leu Pro Leu Ile Phe His Leu Gly Arg Asp Pro
 435 440 445

Gly Glu Arg Phe Pro Leu Ser Phe Ala Ser Ala Glu Tyr Gln Glu Ala
 450 455 460

Leu Ser Arg Ile Thr Ser Val Val Gln Gln His Gln Glu Ala Leu Val
 465 470 475 480

Pro Ala Gln Pro Gln Leu Asn Val Cys Asn Trp Ala Val Met Asn Trp
 485 490 495

ES 2 616 263 T3

Ala Pro Pro Gly Cys Glu Lys Leu Gly Lys Cys Leu Thr Pro Pro Glu
 500 505 510

Ser Ile Pro Lys Lys Cys Leu Trp Ser His
 515 520

<210> 5
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

5

10

Ala Pro Gln Pro Pro Asn Ile Leu Leu Leu Leu Met Asp Asp Met Gly
 1 5 10 15

Trp Gly Asp Leu Gly Val Tyr Gly Glu Pro Ser Arg Glu Thr Pro Asn
 20 25 30

Leu Asp Arg Met Ala Ala Glu Gly Leu Leu Phe Pro Asn Phe Tyr Ser
 35 40 45

Ala Asn Pro Leu Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg
 50 55 60

Leu Pro Ile Arg Asn Gly Phe Tyr Thr Thr Asn Ala His Ala Arg Asn
 65 70 75 80

Ala Tyr Thr Pro Gln Glu Ile Val Gly Gly Ile Pro Asp Ser Glu Gln
 85 90 95

Leu Leu Pro Glu Leu Leu Lys Lys Ala Gly Tyr Val Ser Lys Ile Val
 100 105 110

Gly Lys Trp His Leu Gly His Arg Pro Gln Phe His Pro Leu Lys His
 115 120 125

Gly Phe Asp Glu Trp Phe Gly Ser Pro Asn Cys His Phe Gly Pro Tyr
 130 135 140

Asp Asn Lys Ala Arg Pro Asn Ile Pro Val Tyr Arg Asp Trp Glu Met
 145 150 155 160

Val Gly Arg Tyr Tyr Glu Glu Phe Pro Ile Asn Leu Lys Thr Gly Glu
 165 170 175

Ala Asn Leu Thr Gln Ile Tyr Leu Gln Glu Ala Leu Asp Phe Ile Lys
 180 185 190

ES 2 616 263 T3

Arg Gln Ala Arg His His Pro Phe Phe Leu Tyr Trp Ala Val Asp Ala
 195 200 205

Thr His Ala Arg Val Tyr Ala Ser Lys Pro Phe Leu Gly Thr Ser Gln
 210 215 220

Arg Gly Arg Tyr Gly Asp Ala Val Arg Glu Ile Asp Asp Ser Ile Gly
 225 230 235 240

Lys Ile Leu Glu Leu Leu Gln Asp Leu His Val Ala Asp Asn Thr Phe
 245 250 255

Val Phe Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ala Ala Leu Ile Ser Ala Pro Glu
 260 265 270

Gln Gly Gly Ser Asn Gly Pro Phe Leu Cys Gly Lys Gln Thr Thr Phe
 275 280 285

Glu Gly Gly Met Arg Glu Pro Ala Leu Ala Trp Trp Pro Gly His Val
 290 295 300

Thr Ala Gly Gln Val Ser His Gln Leu Gly Ser Ile Met Asp Leu Phe
 305 310 315 320

Thr Thr Ser Leu Ala Leu Ala Gly Leu Thr Pro Pro Ser Asp Arg Ala
 325 330 335

Ile Asp Gly Leu Asn Leu Leu Pro Thr Leu Leu Gln Gly Arg Leu Met
 340 345 350

Asp Arg Pro Ile Phe Tyr Tyr Arg Gly Asp Thr Leu Met Ala Ala Thr
 355 360 365

Leu Gly Gln His Lys Ala His Phe Trp Thr Trp Thr Asn Ser Trp Glu
 370 375 380

Asn Phe Arg Gln Gly Ile Asp Phe Cys Pro Gly Gln Asn Val Ser Gly
 385 390 395 400

Val Thr Thr His Asn Leu Glu Asp His Thr Lys Leu Pro Leu Ile Phe
 405 410 415

His Leu Gly Arg Asp Pro Gly Glu Arg Phe Pro Leu Ser Phe Ala Ser
 420 425 430

Ala Glu Tyr Gln Glu Ala Leu Ser Arg Ile Thr Ser Val Val Gln Gln
 435 440 445

ES 2 616 263 T3

His Gln Glu Ala Leu Val Pro Ala Gln Pro Gln Leu Asn Val Cys Asn
450 455 460

Trp Ala Val Met Asn Trp Ala Pro Pro Gly Cys Glu Lys Leu Gly Lys
465 470 475 480

Cys Leu Thr Pro Pro Glu Ser Ile Pro Lys Lys Cys Leu Trp Ser His
485 490 495

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificación de una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, en el que dicha enzima GALNS:

tiene una pureza de al menos 95 %, determinada por tinción con azul de Coomassie, cuando se somete a una SDS-PAGE en condiciones no reductoras,

tiene una conversión de al menos 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y

tiene entre 0,5 y 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforilada por cadena de proteína monomérica,

y en el que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora, determinada por electroforesis capilar en gel con dodecil sulfato sódico (SDS-CGE), que comprende:

a) la filtración de un medio de cultivo que contiene la enzima GALNS segregada de una línea celular de mamífero que expresa el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y la enzima GALNS humana recombinante, la ultrafiltración/diafiltración del medio de cultivo filtrado, mediante el cual el medio de cultivo ultrafiltrado/diafiltrado se concentra a aproximadamente 20X, y la filtración en carbón vegetal del medio de cultivo ultrafiltrado/diafiltrado 20 X concentrado;

b) la carga del medio del cultivo ultrafiltrado/diafiltrado 20X filtrado en carbón vegetal de la etapa a) en una columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn, el lavado de la columna en condiciones tales que la enzima GALNS se retenga en la columna y la elución de la enzima GALNS de la columna;

c) la filtración del eluato de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn en la etapa b) a través de un filtro para eliminar los virus;

d) el ajuste del pH del eluato del filtrado de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn de la etapa c) a aproximadamente pH 4,5 ± 0,1 y la filtración del eluato del filtrado de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn ajustado a pH 4,5;

e) la carga del filtrado de la columna de captura de Sefarosa FF quelante con Zn ajustado a pH 4,5 de la etapa d) en una columna de intercambio de cationes Fractogel EMD SE Hi-Cap, el lavado de la columna en condiciones tales que la enzima GALNS se retenga en la columna, y la elución de la enzima GALNS de la columna;

f) el ajuste del pH del eluato de la columna de intercambio de cationes Fractogel EMD SE Hi-Cap de la etapa e) a aproximadamente pH 3,5 ± 0,1 para la inactivación de virus;

g) el ajuste del eluato que ha experimentado inactivación de virus a pH 3,5 de la etapa f) a aproximadamente pH 5,0, después la carga del eluato que ha experimentado inactivación de virus ajustado a pH 5,0 en una columna de pulido ToyoPearl Butyl 650 M, el lavado de la columna en condiciones tales que la enzima GALNS se retenga en la columna, y la elución de la enzima GALNS de la columna;

h) el cambio de tampón del eluato de la columna de pulido ToyoPearl Butyl 650 M de la etapa g) en una formulación que comprende NaOAc/HOAc 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, HCl arginina 30 mM, sorbitol al 2 % (p/v), pH 5,4 y el ajuste de la concentración de la enzima GALNS en la formulación a aproximadamente 3 mg/ml;

i) la retirada de cualquier virus y/o ADN residual filtrando la formulación cuyo tampón se ha cambiado en la etapa h) con un filtro DV20 y un filtro Mustang Q; y

j) la adición de polisorbato 20 (PS20) a la formulación en la etapa i) a una concentración final de 0,01 % (p/v).

2. El uso de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 3-12 que comprende una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, purificada, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece Mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A.

3. Una formulación que comprende

(a) una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, purificada de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y

que tiene una pureza de al menos 95 % determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras,

que tiene una conversión de al menos 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y que tiene entre 0,5 y 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de monómero de proteína,

en la que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en la forma precursora, determinada por SDS-CGE, y

(b) uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables que comprende:

(i) una cantidad de tampón fosfato eficaz para reducir la desfosforilación de dicha enzima GALNS, en el que el tampón fosfato es NaH₂PO₄ a una concentración de aproximadamente 25 mM a 75 mM; y

(ii) una cantidad estabilizante de lo siguiente: una sal o tampón de arginina, opcionalmente clorhidrato de arginina, en el que la sal o el tampón de arginina está a una concentración de aproximadamente 10 mM a 50 mM; un polisorbato, opcionalmente polisorbato 20; y un alcohol de azúcar trihídrico o superior, opcionalmente sorbitol;

en la que dicha formulación está a un pH de aproximadamente 5,0-5,8.

- 5 4. La formulación de la reivindicación 3, en la que la formulación comprende adicionalmente un segundo tampón, opcionalmente tampón acetato.
- 5 5. La formulación de la reivindicación 3, en la que la enzima GALNS tiene una pureza de al menos 95 % determinada por RP-HPLC.
- 10 6. La formulación de la reivindicación 3, en la que entre el 50 % al 80 % de la enzima GALNS se une a una columna de receptor de manosa-6-fosfato.
7. La formulación de la reivindicación 3, en la que la enzima GALNS presenta una absorción específica (Kabsorción) en fibroblastos que es de 1 a 5 nM, preferentemente de 1 a 3,5 nM.
- 15 8. La formulación de la reivindicación 3, en la que la concentración de la enzima GALNS es de aproximadamente 0,5 a 1,5 mg/ml.
9. La formulación de la reivindicación 4, en la que los agentes tampón son NaOAc/HOAc y NaH₂PO₄.
- 20 10. La formulación de la reivindicación 9, en la que la concentración de NaOAc/HOAc es de aproximadamente 10 a 30 mM y la concentración de NaH₂PO₄ es de aproximadamente 25 a 75 mM.
11. La formulación de la reivindicación 3, en la que los estabilizantes son HCl arginina, polisorbato 20 y sorbitol.
- 25 12. La formulación de la reivindicación 11, en la que la concentración de HCl arginina es de aproximadamente 10 a 50 mM, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente 0,005 % a 0,015 % (p/v), y la concentración de sorbitol es de aproximadamente 1,0 % a 3,0 % (p/v).
- 30 13. Una formulación que comprende
- (a) una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, recombinante, purificada de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicha enzima GALNS una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 27 a 522 de SEQ ID NO: 4, y que tiene una pureza de al menos aproximadamente 95 % determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, que tiene una conversión de al menos 50 % del resto de cisteína en la posición 53 en C_α-formilglicina (FGly), y que tiene entre 0,5 a 0,8 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína monomérica, en la que al menos el 98 % de dicha enzima GALNS está en forma precursora determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras, y
- 40 (b) uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables que comprenden:
- (i) NaOAc/HOAc y NaH₂PO₄ como agentes tampón, en el que la concentración de NaOAc/HOAc es de aproximadamente 20 +/- 10 mM y la concentración de NaH₂PO₄ es de aproximadamente 50 +/-25 mM;
- 45 (ii) HCl arginina, polisorbato 20 y sorbitol 20 como estabilizantes, en el que la concentración de HCl arginina es de aproximadamente 30 +/- 20 mM, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente 0,01 % +/- 0,005 % un (p/v) y la concentración de sorbitol es de aproximadamente 2,0 % +/- 1,0 % (p/v); y
- (iii) un pH de aproximadamente 5,4 +/- 0,4.
- 50 14. La formulación de la reivindicación 13 en la que el uno o más de transportadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables consisten esencialmente en:
- (i) NaOAc/HOAc, en el que la concentración de NaOAc/HOAc es de aproximadamente 20 +/- 10 mM;
- (ii) NaH₂PO₄, en el que la concentración de NaH₂PO₄ es de aproximadamente 50 +/-25 mM; y
- 55 (iii) HCl arginina, polisorbato 20 y sorbitol como estabilizantes, en el que la concentración de HCl arginina es de aproximadamente 30 +/- 20 mM, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente 0,01 % +/- 0,005 % (p/v) y la concentración de sorbitol es de aproximadamente 2,0 % +/- 1,0 % (p/v).

FIGURA 1

**SECUENCIA DE POLINUCLEÓTIDOS DEL FACTOR DE MODIFICACIÓN 1
DE SULFATASAS (SUMF1) HUMANO (SEQ ID NO:1)**

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGICTCGTCCCTTGCTGCTGCTGCTC
TCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGGACCGGTGCGGGCGCGGGTCCCTTGCGGGTTCTTGC
GGCTGCGGGCACGCCCCAGCGGCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCTAAC
GCTCCGGGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCCCCATCCCTGCTGGAGTATTTACA
ATGGGCACAGATGATCCTCAGATAAAGCAGGATGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTAC
ATGGATGCCTATGAAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAAGTCAACTGGCTATTTGACAGAGGCTGAG
AAGTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAAGACCAATATTTCAACAGGCAGTTGCA
GCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCCTAACTGGAGACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCAC
AGGCCGGATCATCCAGTTCICCATGTGTCCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGAAGCGGCTG
CCCACGGAAGCTGAGTGGGAATACAGCTGTCGAGGAGGCCTGCATAATAGACTTTTCCCTGGGGCAACAAACTG
CAGCCCAAAGGCCAGCATTATGCCAACATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTC
CAAGGAAGTGCGCCGTGTTGATGCCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATAACAACATAGTGGGGAACGCATGGGAA
TGGACTTCAGACTGGTGGACTGTTTCATCATTCTGTTGAAGAAACGCTTAACCCAAAAGTCCCCCTTCTGGGAAA
GACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCCTACATGTGCCATAGGTCTTATTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGC
CAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTTCGAATCTGGGATTCGCTGTGCAGCCGACCGCTGCCACCATGGACTGA

FIGURA 2

**SECUENCIA DE POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR DE MODIFICACIÓN 1 DE
SULFATASAS (SUMF1) HUMANO (SEQ ID NO:2)**

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYREAN
APGPVPPERQLAHSKMVPPIAGVFTMGTDPPQIKQDGEAPARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEKFNSTGYLAEAE
KFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRL
PTEAEWEYSCRGGLHNRLFPWGNKLPKQGHYANIWQGEFPVNTGEDGFQGTAPVDAFPPNGYGLYNIIVGNAWE
WTSDWWTVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFERCAADRLPTMD

FIGURA 3

SECUENCIA DE POLINUCLEÓTIDOS DE N-ACETILGALACTOSAMINASA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA (SEQ ID NO:3)

ATGGCGGGCGGTTGTGCGGGCGACGAGGTGGTGGCAGCTGTTGCTGGTGTCTCAGCGCCGCGGGGATGGGGGCTCG
GGCGCCCCGAGCCCCCAACATCCCTGCTCCTGCTCATGGACGACATGGGATGGGGTGGACCTCGGGGTGTATGGA
GAGCCCTCCAGAGAGACCCGAATTTGGACCGGATGGCTGCAGAAGGGCTGCTTTTCCCAAACCTTCTATTCTGCC
AACCTCTGTGCTCGCCATCGAGGGCGGCACTGCTCACAGGACGGCTACCCATCCGCAATGGCTTCTACACCACC
AACGCCCATGCCAGAAACGCCTACACACCGCAGGAGATTGTGGGCGGCATCCCAGACTCGGAGCAGCTCCTGCCG
GAGCTTCTGAAGAAGGCCGGCTACGTACAGCAAGATTGTGCGCAAGTGGCATCTGGGTACAGGCCCCAGTTCCAC
CCCCTGAAGCACGGATTTGATGAGTGGTTTGGATCCCCAACTGCCACTTTGGACCTTATGACAACAAGGCCAGG
CCCAACATCCCTGTGTACAGGGACTGGGAGATGGTTGGCAGATATTATGAAGAATTTCCATTAATCTGAAGACG
GGGAAGCCAACCTCACCCAGATCTACCTGCAGGAAGCCCTGGACTTCATTAAGAGACAGGCACGGCACCCACCCC
TTTTTCTCTACTGGGCTGTGACGCCACGCACGCCCTCTATGCCICCAAACCTTCTTGGGCACCAGTCAG
CGAGGGCGGTATGGAGACGCCGTCCGGGAGATTGATGACAGCATGGGAAGATACTGGAGCTCCTCCAAGACCTG
CACGTGCGGGACAACACCTTCGTCTTCTCACGTGCGACAACGGCGCTGCCCTCATTTCGCCCCCGAACAAGGT
GGCAGCAACGGCCCTTTCTGTGTGGGAAGCAGACCAGTGTGAAGGAGGGATGAGGGAGCCTGCCCTCGCATGG
TGGCCAGGGCACGTCACTGCAGGCCAGGTGAGCCACCAGCTGGGCAGCATCATGGACCTCTCACCACCAGCCTG
GCCCTTGGGGCCTGACGCCGCCAGCGACAGGGCCATTGATGGCCTCAACCTCCTCCCCACCCTCCTGCAGGGC
CGGCTGATGGACAGGCCTATCTTCTATTACCGTGGCGACACGCTGATGGCGGCCACCCTCGGGCAGCACAAAGGT
CACTTCTGGACCTGGACCAACTCCTGGGAGAACTTACAGACAGGGCATTGATTTCTGCCCTGGGCAGAACGTTTCA
GGGGTCAAACTCACAATCTGGAAGACCACACGAAGCTGCCCTGATCTTCCACCTGGGACGGGACCCAGGGGAG
AGGTTCCCCCTCAGCTTTGCCAGCGCCGAGTACCAGGAGGCCCTCAGCAGGATCACCTCGGTGCTCCAGCAGCAC
CAGGAGGCCTTGGTCCCCGCGCAGCCCCAGCTCAACGTGTGCAACTGGGCGGTATGAAGTGGGCACCTCCGGGC
TGTGAAAAGTTAGGGAAGTGTCTGACACCTCCAGAATCCATTCCCAAGAAGTGCCTCTGGTCCACTAG

FIGURA 4

SECUENCIA DE POLIPÉPTIDOS DE N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA (SEQ ID NO:4)

MAAVVAATRWWQLLLVLSAAGMGASGAPQPPNILLLLMDDMGWDLGVYGEPSRETPNLDMAAEGLLFPNFYSA
NPLCSPSRAALLTGRLPIRNGFYTTNAHARNAYTPQEIVGGIPDSEQLLPELLKKAGYVSKIIVGKWHLGHRPQFH
PLKHGFDEWFGSPNCHFGPYDNKARPNI PVYRDWEMVGRYEEFPINLKTGEANLTQIYLYQEALDFIKRQARHHP
FFLYWAVDATHAPVYASKPFLGTSQRGRYGDVREIDDSIGKILELLQDLHVADNTFVFFTS DNGAALISAPEQG
GSNGPFLCGKQTTFEGMREPALAWWPGHVVTAGQVSHQLGSIMDLFTTSLALAGLTPPSDRAIDGLNLLPTLLQG
RLMDRPIFYRGTLM AATLGQHKAHFWTWTNSWENFRQGIDFCPGQNVSGVTTHNLEDHTKLP LIFHLGRDPGE
RFPLSFASAEYQEALS RITSVVQQHQEALVPAQPQLNVCNWAVMNWAPPGCEKLGKCLTPPESIPKKCLWSH

FIGURA 5

ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) (SEQ ID NO: 5)

1	APQPPNILL	LMDDMGWGD	GVYGEFSRET	PNLDRMAAEG	LEPPNFYGN	Forma procesada
31	ELC C SPSRAAL	LYGRPLIRNG	FYETNARAPN	AYTPQELVGG	IPDSEQLLPE	
101	LLKLAGYVCK	IVGKNHLGR	PQFHPLKAGF	DEWFGSPNCH	FGPYDNKAKP	~40 kDa
151	NIPVYSDWEM	VGRYYEFPFI	NLKTGEA NLT	QIXLQEALDF	IKKQAPHHFF	
201	FLYWAYDAIB	ARVTAGKFFL	GTSQRGRYGD	AVPEIDDSIG	KILELLQDLR	~19 kDa
251	VADNTFVFFT	SDNGAALISA	DEQGGGNDP	LCGKQTFEG	GMKEDALAW	
301	FGHVTAGQVS	HQLGSINDLF	TTLALAGLT	PPSDRAIDGL	NLLPTLLQGR	~19 kDa
351	LMDRPIFYR	GDTLMAATLG	QKKAHFWTWT	NSWENFRQGI	DFCPG C VSG	
401	VTHNLEDHT	KLPLIFHLGR	DPGERFPLSF	ASAEYQEALS	RITSVVQQHQ	~19 kDa
451	EALVPAQPQL	NVCNWAVMNW	APPGCEKLGK	CLTPPESIPK	KCLWSH	

- 1) Peso molecular de la enzima pre-procesada: ~55 kDa
- 2) Conversión de cisteína en C α -formilglicina en la posición 53
- 3) Formas procesadas en lisosomas unidas por puentes disulfuro
- 4) 2 sitios de glicosilación ligada a N en las posiciones 178 y 397
- 5) BisP encontrado en Asn178, no en Asn397

FIGURA 7

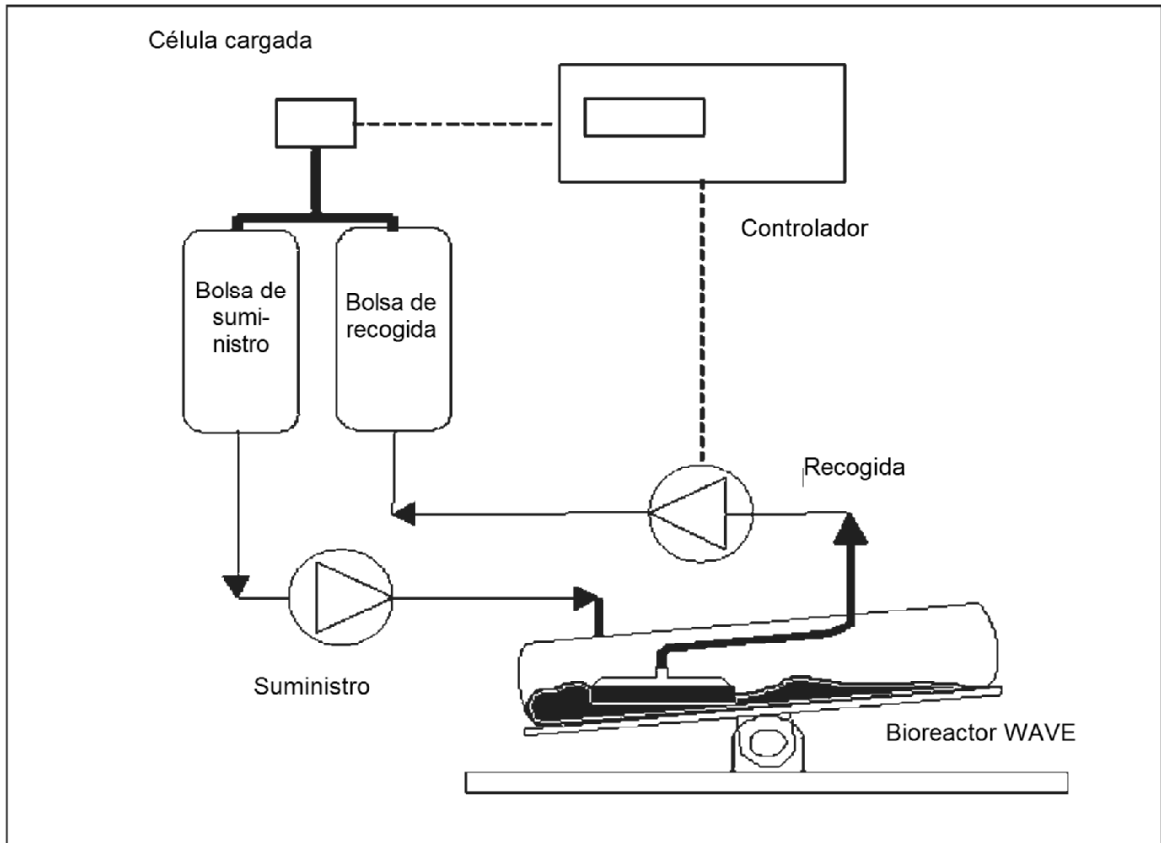


FIGURA 8

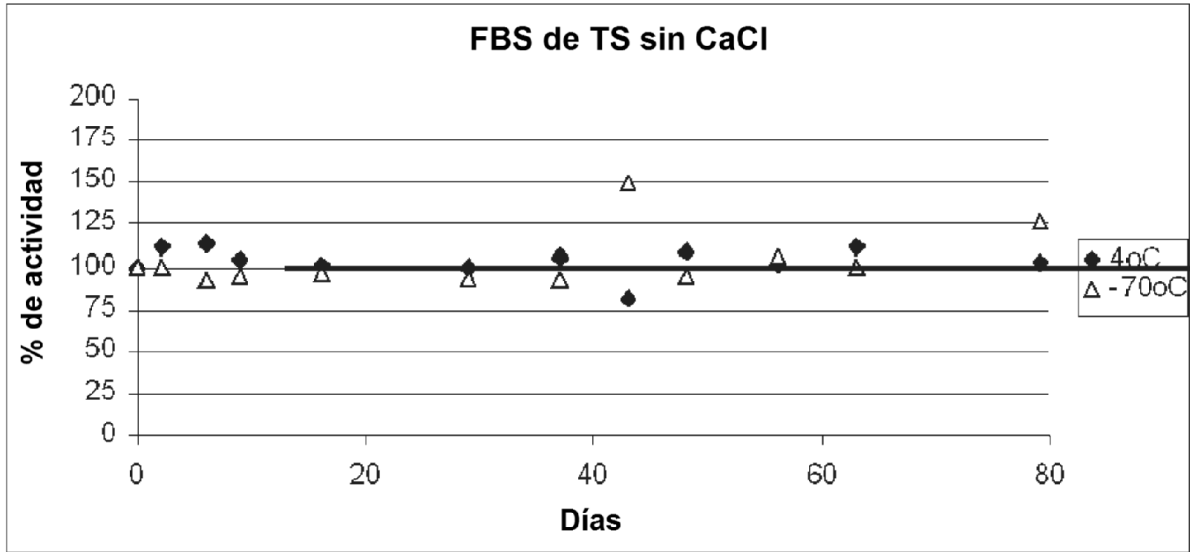
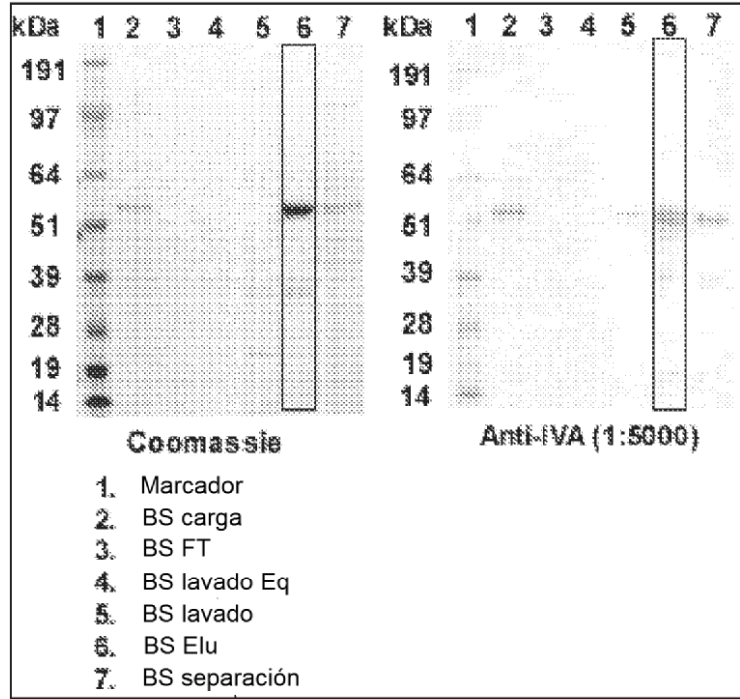


FIGURA 9A-B

A. Cromatografía azul Sefarosa 6 FF



B. Cromatografía Fractogel SE Hi-Cap

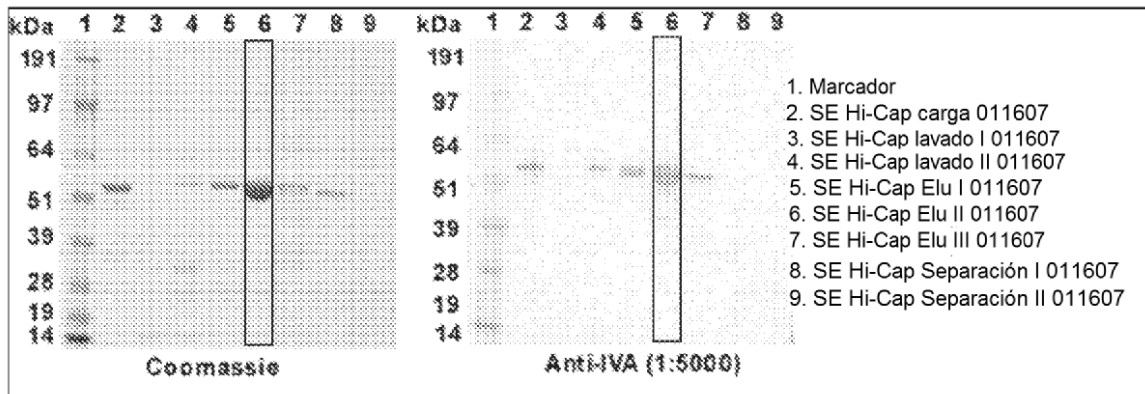
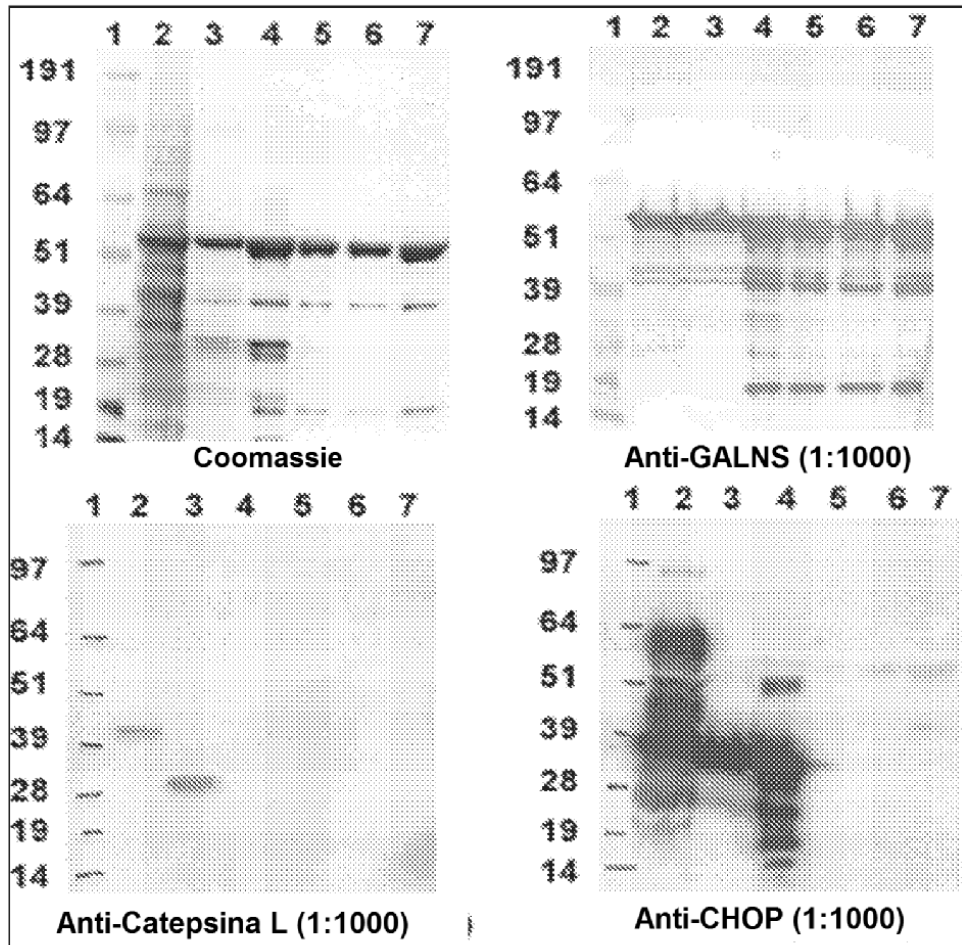


FIGURA 10



1. Marcador
2. UF/DF
3. SE Hi-Cap carga 042108
4. SE Hi-Cap Eluato 042108
5. Zn Eluato 042208
6. TPB Eluato 042408
7. FBDS 042508

FIGURA 11

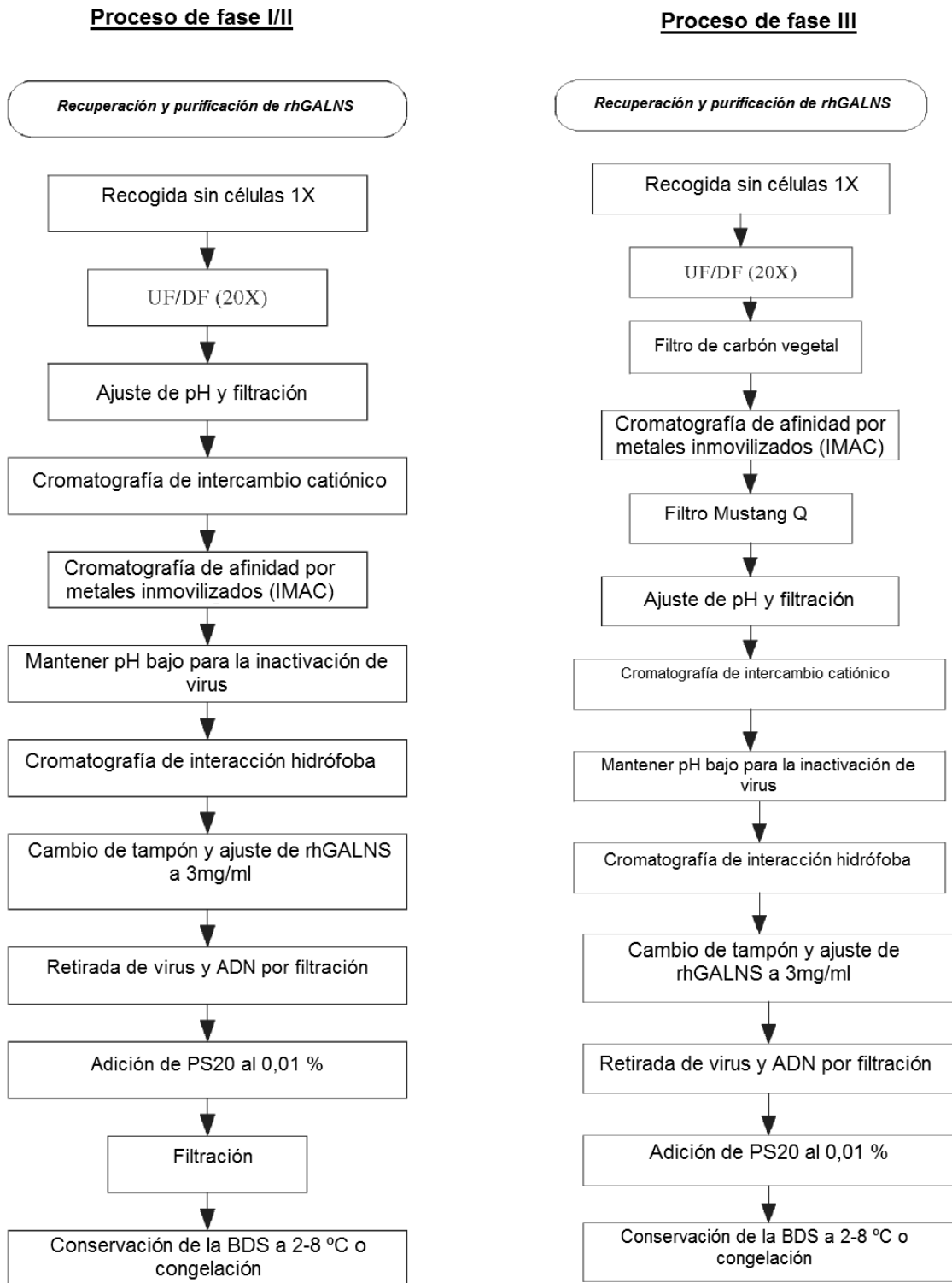


FIGURA 12

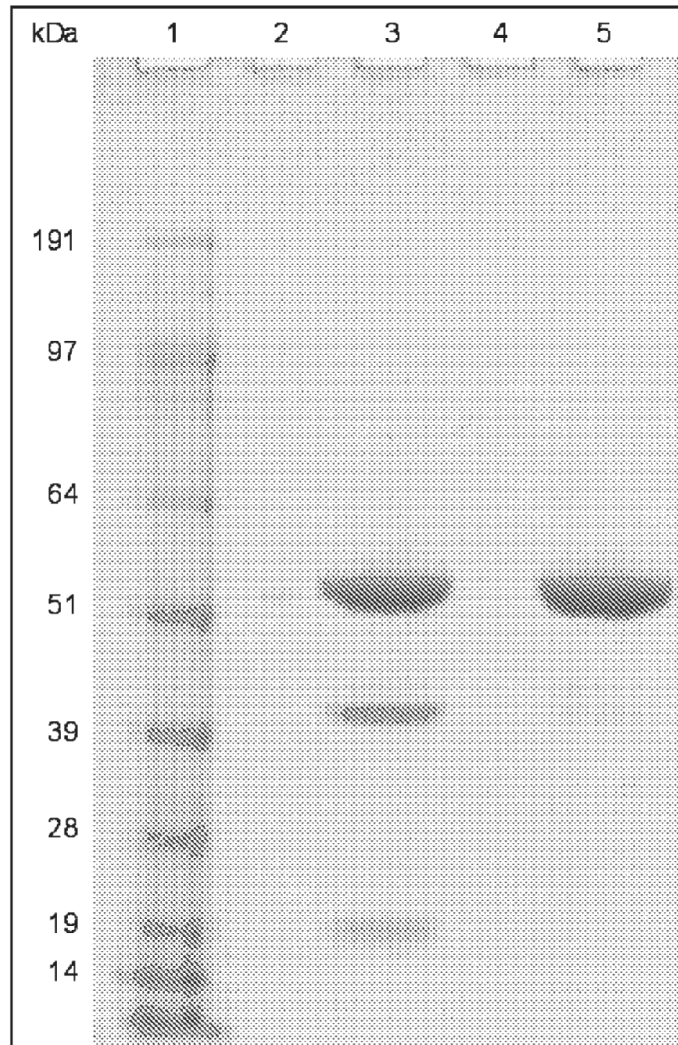


FIGURA 13

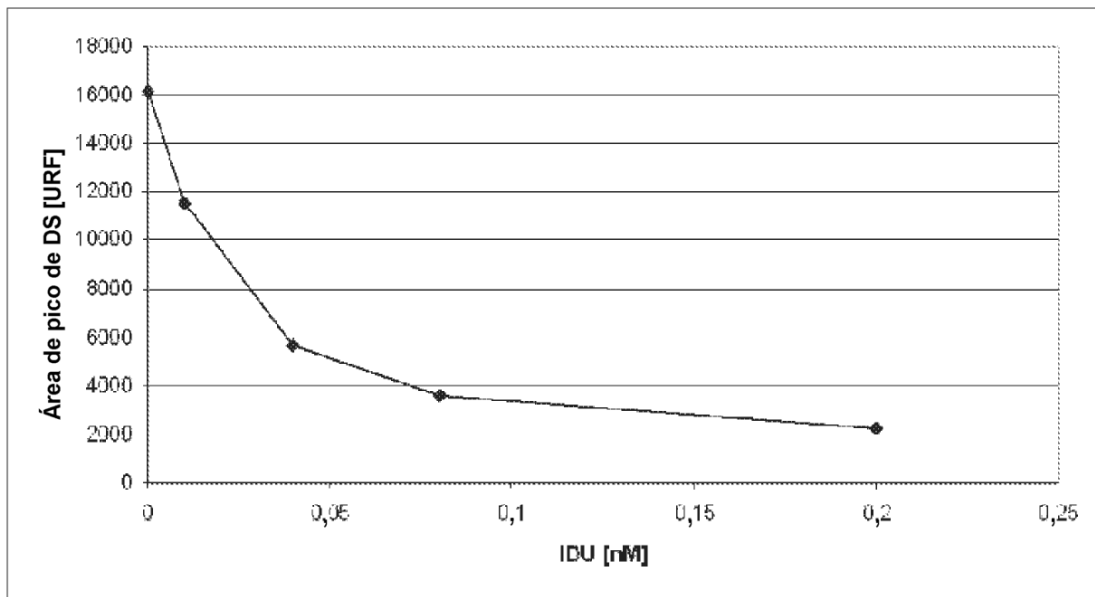


FIGURA 14

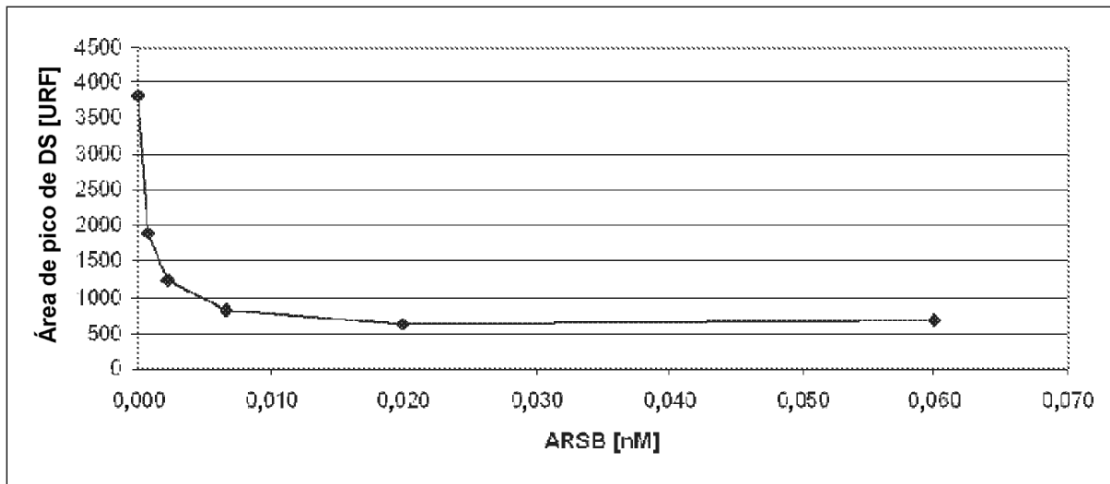


FIGURA 15

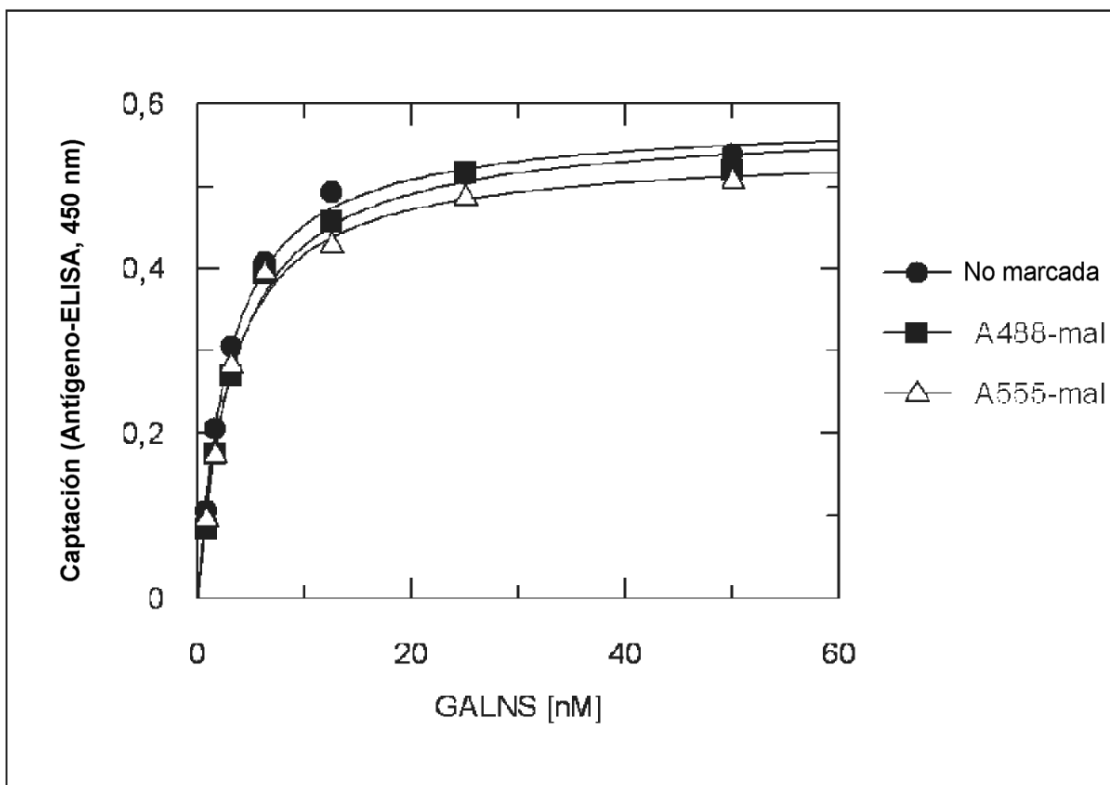


FIGURA 16

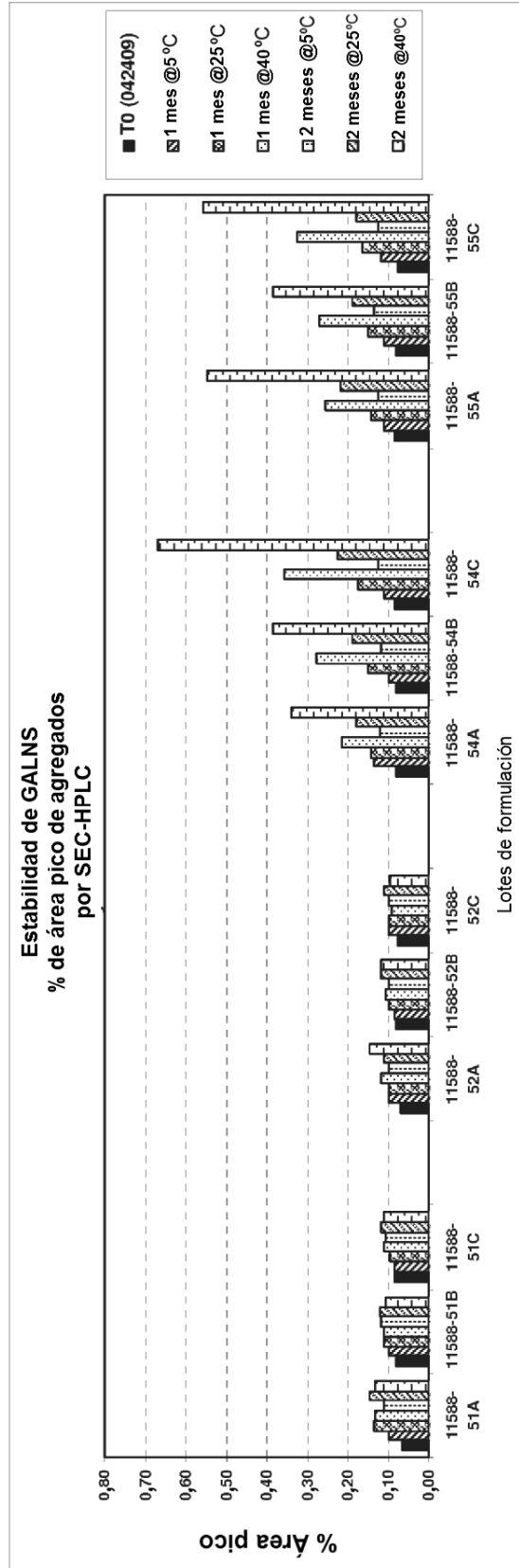


FIGURA 17

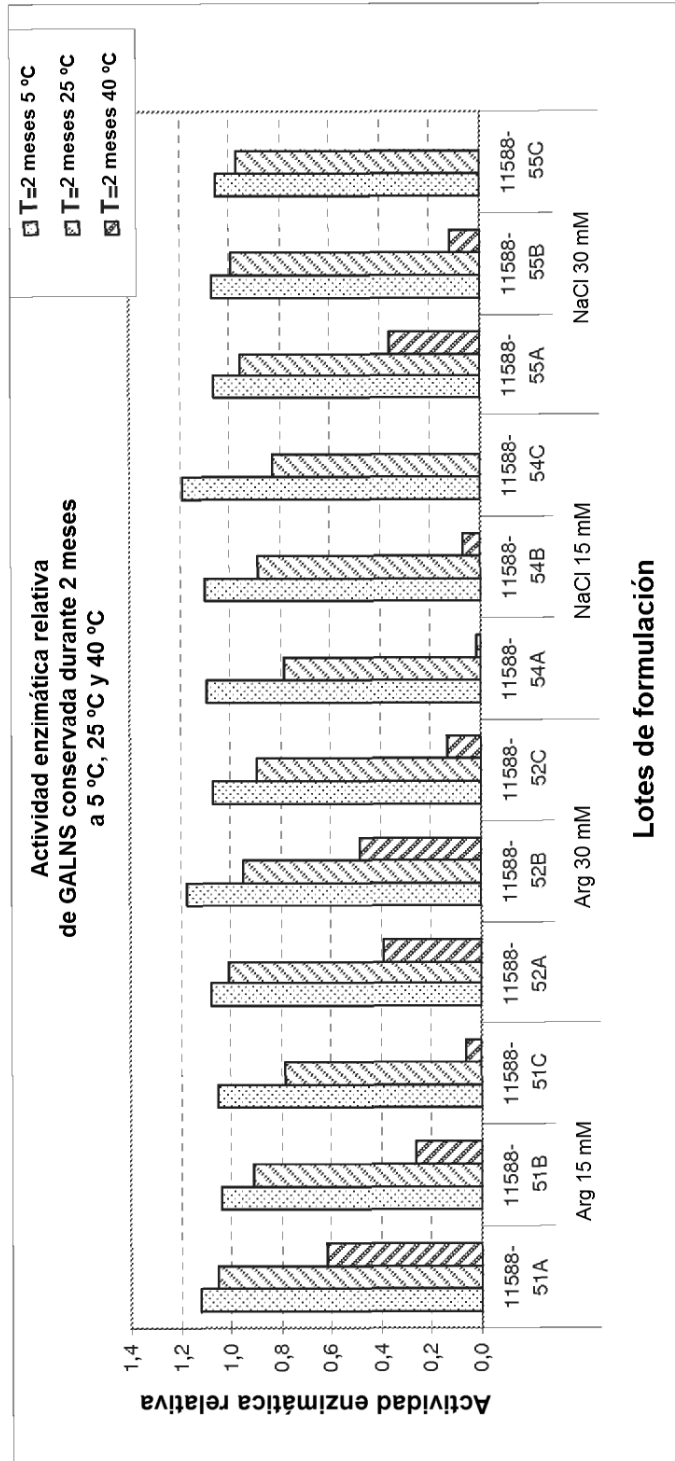


FIGURA 18

Tiempo 2 meses - 5°C		HCl de L-arginina 15 mM		HCl de L-arginina 30 mM		NaCl 15 mM		NaCl 30 mM		
	pH5,0	pH5,4	pH 5,8	pH5,0	pH5,4	pH 5,8	pH5,0	pH5,4	pH 5,8	Referencia
BPM7	34,3	32,3	34,9	33,9	33,2	34,3	34,0	33,3	34,3	32,1
Tiempo 2 meses - 25°C										
Tiempo 2 meses - 40°C		HCl de L-arginina 15 mM		HCl de L-arginina 30 mM		NaCl 15 mM		NaCl 30 mM		
	pH5,0	pH5,4	pH 5,9	pH5,0	pH5,4	pH 5,9	pH5,0	pH5,4	pH 5,9	Referencia
BPM7	34,4	34,6	35,2	34,6	33,6	35,1	34,1	34,0	35,0	34,4
Tiempo 2 meses - 40°C										
Tiempo 2 meses - 5°C		HCl de L-arginina 15 mM		HCl de L-arginina 30 mM		NaCl 15 mM		NaCl 30 mM		
	pH5,0	pH5,4	pH 5,10	pH5,0	pH5,4	pH 5,10	pH5,0	pH5,4	pH 5,10	Referencia
BPM7	30,2	29,7	32,5	30,0	30,0	31,2	33,3	30,7	33,9	34,4

FIGURA 19

