

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 511**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2012 PCT/US2012/045927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13009686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2012 E 12738681 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2729566**

54 Título: **Métodos para la purificación de arylsulfatasa A**

30 Prioridad:  
**08.07.2011 US 201161506023 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2017**

73 Titular/es:  
**SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.  
(100.0%)  
300 Shire Way  
Lexington MA 02421, US**

72 Inventor/es:  
**YANG, YING y  
WANG, YONG**

74 Agente/Representante:  
**MARIA ALICIA , Izquierdo Blanco**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 625 511 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****Métodos para la purificación de arilsulfatasa A****5 ANTECEDENTES**

La leucodistrofia metacromática (LMC o MLD, por sus siglas en inglés) se debe a un defecto genético autosómico y recesivo en la enzima lisosómica arilsulfatasa A (ASA o ARSA), lo que provoca la descomposición progresiva de las membranas de la vaina de mielina (desmielinización) y la acumulación de galactosil sulfátido (sulfato de cerebrósido) en la materia blanca del sistema nervioso central (SNC o CNS, por sus siglas en inglés) y el sistema nervioso periférico. Los pacientes con leucodistrofia metacromática pueden tratarse con terapia de sustitución enzimática (TSE o ERT, por sus siglas en inglés) utilizando arilsulfatasa A recombinante (rASA).

WO2005/073367 desvela un método para depurar o purificar la arilsulfatasa A de una muestra, de manera que el método comprende: proporcionar una muestra de arilsulfatasa A; someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio aniónico, seguida de una cromatografía de interacción hidrofóbica, seguida de una cromatografía de intercambio catiónico.

**20 RESUMEN**

La divulgación está relacionada, entre otros, con los métodos para producir arilsulfatasa A. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para purificar arilsulfatasa A de una muestra. Los métodos descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de cromatografía. Los pasos de cromatografía ejemplares incluyen -pero no se limitan a- la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico o de intercambio catiónico), la cromatografía en modo mixto y la cromatografía hidrofóbica. Además, se desvelan composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que contienen la arilsulfatasa A y métodos que usan la arilsulfatasa A producida mediante los métodos descritos en el presente texto.

La invención proporciona un método para depurar o purificar la arilsulfatasa A (ASA) de una muestra, el cual comprende: proporcionar una muestra de ASA; someter la muestra a una primera cromatografía de intercambio iónico, que es una cromatografía de intercambio aniónico; someter la muestra a una cromatografía en modo mixto; someter la muestra a una cromatografía de interacción hidrofóbica; y someter la muestra a una segunda cromatografía de intercambio iónico, de manera que la muestra se somete a la cromatografía en modo mixto antes de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para purificar arilsulfatasa A de una muestra. El método incluye, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A (por ejemplo, arilsulfatasa A recombinante) y someter la muestra a una cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, la cromatografía de intercambio aniónico que se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio aniónico incluye una cromatografía de intercambio aniónico de aminas cuaternarias. La cromatografía de intercambio aniónico puede realizarse usando, por ejemplo, Q SEPHAROSE™ (Sefarosa) Fast Flow ('De flujo rápido'), Q SEPHAROSE™ High Performance ('De alto rendimiento'), Q SEPHAROSE™ XL, CAPTO™ Q, DEAE, TOYOPEARL GIGACAP® Q, FRACTOGEL® TMAE, ESHMUNO™ Q, NUVIA™ Q o UNOSPHERE™ Q.

En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio aniónico incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en una columna de cromatografía aniónica, lavar la columna de cromatografía de intercambio aniónico y eluir la arilsulfatasa A de la columna.

En algunas realizaciones, para cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio aniónico se utiliza un tampón de carga ('loading buffer', en inglés). En una realización, el tampón de carga no contiene cloruro de sodio. En otra realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 25 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 10 mM, de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 5 mM o de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 10 mM.

En algunas realizaciones, el proceso de carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza con un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de cromatografía de intercambio aniónico con una capacidad de enlace o capacidad de unión de alrededor de 15 g/L de resina o menos, por ejemplo, de alrededor de 10 g/L de resina o menos, alrededor de 5 g/L de resina o menos, o alrededor de 2 g/L de resina o menos, por ejemplo, entre alrededor de 2 g/L de resina y alrededor de 5 g/L de resina, entre alrededor de 5 g/L de resina y alrededor de 10 g/L de resina, o entre alrededor de 10 g/L de resina y alrededor de 15 g/L de resina.

En algunas realizaciones, el proceso para lavar la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza con uno o más tampones de lavado ('washing buffer', en inglés). Por ejemplo, el lavado de la columna de intercambio aniónico puede incluir uno o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, de manera que cada uno utiliza un tampón de lavado diferente.

En una realización, el tampón de lavado no contiene cloruro de sodio. En otra realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de lavado tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 200 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 150 mM, de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 200 mM, de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 150 mM, por ejemplo, de alrededor de 80 mM, alrededor de 100 mM, alrededor de 120 mM o alrededor de 140 mM.

En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se realiza con un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se utiliza un tampón de elución.

En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de elución tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 500 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 300 mM, o de entre alrededor de 200 mM y alrededor de 400 mM, por ejemplo, de alrededor de 180 mM, alrededor de 200 mM, alrededor de 220 mM, alrededor de 240 mM, alrededor de 260 mM o alrededor de 280 mM.

En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se utiliza un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

En algunas realizaciones, el proceso para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio aniónico incluye uno o más pasos de extracción o recogida en el pico de elución ('elution peak collection', en inglés). Por ejemplo, la recogida en el pico de elución comienza desde alrededor de 50 mAU (o mUA) en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 200 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 200 mAU en el lado descendente, o desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nM.

El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución que se describen en el presente texto pueden incluir uno o más agentes amortiguadores. Por ejemplo, el agente amortiguador puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio, o una combinación de estos compuestos. El agente amortiguador tiene una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 500 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 250 mM, de entre alrededor de 20 mM y alrededor de 100 mM, de entre alrededor de 1 mM y 5 mM, de entre alrededor de 5 mM y 10 mM, de entre alrededor de 10 mM y 50 mM, o de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 50 mM.

En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio aniónico se realiza a una temperatura de alrededor de 23° C o menos, alrededor de 18° C o menos, o alrededor de 16° C o menos, por ejemplo, alrededor de 23° C, alrededor de 20° C, alrededor de 18° C o alrededor de 16° C.

En una realización, la arilsulfatasa A se depura a pequeña escala o escala de laboratorio. En otra realización, la arilsulfatasa A se depura a escala de fabricación.

En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de la arilsulfatasa A es de al menos alrededor de un 75%, por ejemplo, al menos alrededor de un 85%, por ejemplo, entre alrededor de un 85% y alrededor de un 99%, o entre alrededor de un 90% y alrededor de un 99%.

En algunas realizaciones, el rendimiento proteico (UA, Unidades de Absorbancia o AU, por sus siglas en inglés) es de entre alrededor del 10% y el 50%, por ejemplo, de entre alrededor del 20% y alrededor del 35%, o de entre alrededor del 25% y alrededor del 30%, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nM.

En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV, por sus siglas en inglés) de las proteínas

de células huésped (HCP, por sus siglas en inglés) es de entre alrededor de 0,5 y alrededor de 1,0, por ejemplo, entre alrededor de 0,6 y 0,9, o entre alrededor de 0,7 y 0,8.

5 En algunos métodos de la presente invención, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto, que puede incluir, por ejemplo, una cromatografía de hidroxapatita cerámica (HA), por ejemplo, una cromatografía de hidroxapatita de tipo I o de tipo II, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a una cromatografía de intercambio aniónico previamente a la cromatografía en modo mixto.

10 En algunos métodos de la presente invención, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés), por ejemplo, una cromatografía de fenilo, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a una cromatografía de intercambio aniónico previamente a la HIC.

15 En algunas realizaciones, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP), por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a una cromatografía de intercambio aniónico previamente a la cromatografía de intercambio catiónico.

20 En algunas realizaciones, un método incluye, adicionalmente, recoger la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante un método que incluye ultrafiltración de flujo tangencial.

25 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una filtración en profundidad, por ejemplo, usando un filtro de profundidad ZETA PLUS®.

30 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una inactivación viral. En una realización, la inactivación viral comprende un disolvente y/o un detergente. El disolvente o detergente puede incluir, por ejemplo, polisorbato 80, Tri-n-Butil-Fosfato (TnBP) o ambos. En otra realización, la inactivación viral comprende la filtración de virus, por ejemplo, usando un filtro PLANOVA™.

35 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye concentrar y/o filtrar la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o diafiltración, por ejemplo, mediante ultrafiltración de flujo tangencial.

40 En algunas realizaciones, la actividad específica de la arilsulfatasa A purificada es de -al menos- entre alrededor de 50 U/mg y alrededor de 140 U/mg, por ejemplo, al menos alrededor de 70 U/mg, al menos alrededor de 90 U/mg, al menos alrededor de 100 U/mg, o al menos alrededor de 120 U/mg, por ejemplo, tal y como se determina mediante un método descrito en el presente texto.

45 En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica hasta al menos alrededor de un 95%, al menos alrededor de un 98%, al menos alrededor de un 99%, al menos alrededor de un 99,5%, al menos alrededor de un 99,6%, al menos alrededor de un 99,7%, al menos alrededor de un 99,8%, o al menos alrededor de un 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes métodos: 'Western blot' de las proteínas de células huésped (HCP), SDS-PAGE con tinción de Coomassie, SDS-PAGE con tinción con plata, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión de tamaño.

50 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye preparar o formular la arilsulfatasa A purificada. El tampón utilizado para preparar la arilsulfatasa A purificada puede incluir, por ejemplo, cloruro de sodio.

55 En un aspecto, la divulgación presenta un método para purificar arilsulfatasa A de una muestra, de manera que el método incluye, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A (por ejemplo, arilsulfatasa A recombinante) y someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto, por ejemplo, la cromatografía en modo mixto que se describe en el presente texto; como, por ejemplo, un método que incluye una cromatografía de hidroxapatita cerámica (HA), por ejemplo, una cromatografía de hidroxapatita de tipo I o de tipo II. En algunas realizaciones, la cromatografía en modo mixto se realiza usando uno o más de los siguientes: medios o materiales de cerámica de Hidroxapatita de Tipo I CHT™, medios o materiales de cerámica de Hidroxapatita de Tipo II CHT™, HT Hidroxapatita de BIO-GEL® y HTP Hidroxapatita de BIO-GEL®.

60 En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en una columna de cromatografía en modo mixto (por ejemplo, cromatografía de HA), lavar la columna de la cromatografía en modo mixto y eluir la arilsulfatasa A de la columna.

65 En algunas realizaciones, para cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía en modo mixto se utiliza un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de fosfato de sodio de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 10 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 5 mM, de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 10 mM, por ejemplo, alrededor de 1 mM, alrededor de 2 mM, o alrededor de 5 mM. En otra realización, el tampón de

carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 400 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 200 mM y alrededor de 300 mM, por ejemplo, alrededor de 220 mM, alrededor de 240 mM, alrededor de 260 mM, o alrededor de 280 mM.

5 En algunas realizaciones, el proceso de carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía en modo mixto se realiza con un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

10 En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de cromatografía en modo mixto con una capacidad de enlace o capacidad de unión de alrededor de 23 AU/L de resina o menos, por ejemplo, alrededor de 19 AU/L de resina o menos, alrededor de 15 AU/L de resina o menos, o alrededor de 12 AU/L de resina o menos, por ejemplo, entre alrededor de 12 AU/L de resina y alrededor de 15 AU/L de resina, o entre alrededor de 15 AU/L de resina y alrededor de 19 AU/L de resina.

15 En algunas realizaciones, el proceso para lavar la columna de cromatografía en modo mixto se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de cromatografía en modo mixto puede incluir uno o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, de manera que cada uno utiliza un tampón de lavado diferente.

20 En una realización, el tampón de lavado contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, el tampón de lavado tiene una concentración de fosfato de sodio de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 10 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 5 mM, de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 10 mM, por ejemplo, de alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM o alrededor de 10 mM. En otra realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de lavado tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 600 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 500 mM, o de entre alrededor de 200 mM y alrededor de 400 mM, por ejemplo, alrededor de 220 mM, alrededor de 240 mM, alrededor de 260 mM, o alrededor de 280 mM.

30 En algunas realizaciones, el lavado de la columna de cromatografía en modo mixto se realiza con un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

35 En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía en modo mixto se utiliza un tampón de elución.

40 En una realización, el tampón de elución contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, el tampón de elución tiene una concentración de fosfato de sodio de entre alrededor de 20 mM y alrededor de 50 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 45 mM, por ejemplo, de alrededor de 30 mM, alrededor de 35 mM, o alrededor de 40 mM. En otra realización, el tampón de elución no contiene cloruro de sodio. En otra realización, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de elución tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 200 mM y alrededor de 300 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 240 mM y alrededor de 280 mM.

45 En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía en modo mixto se utiliza un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

50 En algunas realizaciones, el proceso para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía en modo mixto incluye uno o más pasos de recogida en el pico de elución ('elution peak collection', en inglés). Por ejemplo, la recogida en el pico de elución comienza desde alrededor de 50 mAU (o mUA) en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 200 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 200 mAU en el lado descendente, o desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nM.

60 El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución que se describen en el presente texto pueden incluir uno o más agentes amortiguadores. Por ejemplo, el agente amortiguador puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio, o una combinación de estos compuestos. El agente amortiguador tiene una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 500 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 250 mM, de entre alrededor de 20 mM y alrededor de 100 mM, de entre alrededor de 1 mM y 5 mM, de entre alrededor de 5 mM y 10 mM, de entre alrededor de 10 mM y 50 mM, o de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 50 mM.

65

En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto se realiza a una temperatura de alrededor de 23° C o menos, alrededor de 18° C o menos, o alrededor de 16° C o menos, por ejemplo, alrededor de 23° C, alrededor de 20° C, alrededor de 18° C o alrededor de 16° C.

5 En una realización, la arilsulfatasa A se depura a pequeña escala o escala de laboratorio. En otra realización, la arilsulfatasa A se depura a escala de fabricación.

10 En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de la arilsulfatasa A es de al menos alrededor de un 80%, por ejemplo, al menos alrededor de un 90%, por ejemplo, entre alrededor de un 80% y alrededor de un 115%.

15 En algunas realizaciones, el rendimiento proteico (UA, Unidades de Absorbancia o AU, por sus siglas en inglés) es de entre alrededor del 30% y alrededor del 80%, por ejemplo, de entre alrededor del 35% y alrededor del 75%, o de entre alrededor del 50% y alrededor del 70%, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de las proteínas de células huésped (HCP) es de entre alrededor de 0,3 y alrededor de 0,6, por ejemplo, entre alrededor de 0,4 y 0,5.

20 En algunos métodos de la presente invención, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), por ejemplo, una cromatografía de fenilo, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto, y la muestra de arilsulfatasa A se somete a una cromatografía en modo mixto previamente a la HIC.

25 En algunas realizaciones, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP), por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a una cromatografía de intercambio aniónico previamente a la cromatografía de intercambio catiónico.

30 En algunas realizaciones, un método incluye, adicionalmente, recoger la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante un método que incluye ultrafiltración de flujo tangencial.

En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una filtración en profundidad, por ejemplo, usando un filtro de profundidad ZETA PLUS®.

35 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una inactivación viral. En una realización, la inactivación viral comprende un disolvente y/o un detergente. El disolvente o detergente puede incluir, por ejemplo, polisorbato 80, Tri-n-Butil-Fosfato (TnBP) o ambos. En otra realización, la inactivación viral comprende la filtración de virus, por ejemplo, usando un filtro PLANOVA™.

40 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye concentrar y/o filtrar la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o diafiltración, por ejemplo, mediante ultrafiltración de flujo tangencial.

45 En algunas realizaciones, la actividad específica de la arilsulfatasa A purificada es de -al menos- entre alrededor de 50 U/mg y alrededor de 140 U/mg, por ejemplo, al menos alrededor de 70 U/mg, al menos alrededor de 90 U/mg, al menos alrededor de 100 U/mg, o al menos alrededor de 120 U/mg, por ejemplo, tal y como se determina mediante un método descrito en el presente texto.

50 En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica hasta al menos alrededor de un 95%, al menos alrededor de un 98%, al menos alrededor de un 99%, al menos alrededor de un 99,5%, al menos alrededor de un 99,6%, al menos alrededor de un 99,7%, al menos alrededor de un 99,8%, o al menos alrededor de un 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes métodos: 'Western blot' de las proteínas de células huésped (HCP), SDS-PAGE con tinción de Coomassie, SDS-PAGE con tinción con plata, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión de tamaño.

55 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye preparar o formular la arilsulfatasa A purificada. El tampón utilizado para preparar la arilsulfatasa A purificada puede incluir, por ejemplo, cloruro de sodio.

60 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para purificar arilsulfatasa A de una muestra, de manera que el método incluye, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A (por ejemplo, arilsulfatasa A recombinante), y someter la muestra de arilsulfatasa A a cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), por ejemplo, la cromatografía de interacción hidrofóbica que se describe en el presente texto. En una realización, la cromatografía de interacción hidrofóbica incluye una cromatografía de fenilo. En otras realizaciones, la cromatografía de interacción hidrofóbica incluye una cromatografía de butilo o una cromatografía de octilo.

65 En algunas realizaciones, la cromatografía de interacción hidrofóbica incluye una cromatografía de fenilo que utiliza uno o más de los siguientes compuestos: Phenyl SEPHAROSE™ High Performance, Phenyl

## ES 2 625 511 T3

SEPHAROSE™ 6 Fast Flow ('low sub'), o Phenyl SEPHAROSE™ 6 Fast Flow ('high sub').

5 En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de interacción hidrofóbica incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de HIC, lavar la columna de HIC y eluir la arilsulfatasa A de la columna.

10 En algunas realizaciones, para cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de HIC se utiliza un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 0,5 M y alrededor de 2,5 M, por ejemplo, de alrededor de 1 M o alrededor de 1,5 M. En otra realización, el tampón de carga contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de fosfato de sodio de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 25 mM, alrededor de 50 mM, o alrededor de 75 mM.

15 En algunas realizaciones, el proceso de carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de HIC se realiza con un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 7, por ejemplo, de entre alrededor de 5,5 y alrededor de 6,5, por ejemplo, de alrededor de 5,5, alrededor de 6,0 o alrededor de 6,5.

20 En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de HIC con una capacidad de enlace o capacidad de unión de alrededor de 12 AU/L de resina o menos, por ejemplo, alrededor de 10 AU/L de resina o menos, alrededor de 9 AU/L de resina o menos, alrededor de 7 AU/L de resina o menos, o alrededor de 5 AU/L de resina o menos, por ejemplo, entre alrededor de 5 AU/L de resina y alrededor de 9 AU/L de resina, o entre alrededor de 5 AU/L de resina y alrededor de 7 AU/L de resina.

25 En algunas realizaciones, el proceso para lavar la columna de HIC se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de HIC puede incluir uno o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, de manera que cada uno utiliza un tampón de lavado diferente.

30 En una realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de lavado tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 100 mM y alrededor de 1,5 M, por ejemplo, de entre alrededor de 250 mM y alrededor de 1 M, por ejemplo, alrededor de 250 mM, alrededor de 500 mM, alrededor de 750 mM, o alrededor de 1 M. En otra realización, el tampón de lavado contiene fosfato de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de fosfato de sodio de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, de alrededor de 25 mM, alrededor de 50 mM o alrededor de 75 mM.

35 En algunas realizaciones, el proceso de lavado de la columna de HIC se realiza con un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 7, por ejemplo, de entre alrededor de 5,5 y alrededor de 6,5, por ejemplo, de alrededor de 5,5, alrededor de 6,0 o alrededor de 6,5.

40 En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de HIC se utiliza un tampón de elución.

45 En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de elución tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 30 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 45 mM y alrededor de 85 mM, por ejemplo, de alrededor de 50 mM, alrededor de 60 mM, alrededor de 70 mM o alrededor de 80 mM.

50 En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de HIC se utiliza un pH de entre alrededor de 5 y alrededor de 9, por ejemplo, de entre alrededor de 6 y alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 7.

55 En algunas realizaciones, el proceso para eluir la arilsulfatasa A de la columna de HIC incluye uno o más pasos de recogida en el pico de elución ('elution peak collection', en inglés). Por ejemplo, la recogida en el pico de elución comienza desde alrededor de 50 mAU (o mUA) en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 200 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 200 mAU en el lado descendente, o desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nM.

60 El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución que se describen en el presente texto pueden incluir uno o más agentes amortiguadores. Por ejemplo, el agente amortiguador puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio, o una combinación de estos compuestos. El agente amortiguador tiene una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 500 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 250 mM, de entre alrededor de 20 mM y alrededor de 100 mM, de entre alrededor de 1 mM y 5 mM, de entre alrededor de 5 mM y 10 mM, de entre alrededor de 10 mM y 50 mM, o de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10

mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 50 mM.

5 En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una HIC se realiza a una temperatura de alrededor de 23° C o menos, alrededor de 18° C o menos, o alrededor de 16° C o menos, por ejemplo, alrededor de 23° C, alrededor de 20° C, alrededor de 18° C o alrededor de 16° C.

En una realización, la arilsulfatasa A se depura a pequeña escala o escala de laboratorio. En otra realización, la arilsulfatasa A se depura a escala de fabricación.

10 En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de la arilsulfatasa A es de al menos alrededor de un 60%, por ejemplo, al menos alrededor de un 70%, por ejemplo, entre alrededor de un 70% y alrededor de un 100%.

15 En algunas realizaciones, el rendimiento proteico (UA, Unidades de Absorbancia o AU, por sus siglas en inglés) es de entre alrededor del 45% y alrededor del 100%, por ejemplo, de entre alrededor del 50% y alrededor del 95%, o de entre alrededor del 55% y alrededor del 90%, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

20 En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de las proteínas de células huésped (HCP) es de entre alrededor de 0,6 y alrededor de 1,2, por ejemplo, entre alrededor de 0,7 y 0,95.

25 En algunos métodos de la presente invención, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP), por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a una HIC previamente a la cromatografía de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, un método incluye, adicionalmente, recoger la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante un método que incluye ultrafiltración de flujo tangencial.

30 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una filtración en profundidad, por ejemplo, usando un filtro de profundidad ZETA PLUS®.

35 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una inactivación (o desactivación) viral. En una realización, la inactivación viral comprende un disolvente y/o un detergente. El disolvente o detergente puede incluir, por ejemplo, polisorbato 80, Tri-n-Butil-Fosfato (TnBP) o ambos. En otra realización, la inactivación viral comprende la filtración de virus, por ejemplo, usando un filtro PLANOVA™.

En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye concentrar y/o filtrar la muestra de arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante ultrafiltración y/o diafiltración, por ejemplo, mediante ultrafiltración de flujo tangencial.

40 En algunas realizaciones, la actividad específica de la arilsulfatasa A purificada es de -al menos- entre alrededor de 50 U/mg y alrededor de 140 U/mg, por ejemplo, al menos alrededor de 70 U/mg, al menos alrededor de 90 U/mg, al menos alrededor de 100 U/mg, o al menos alrededor de 120 U/mg, por ejemplo, tal y como se determina mediante un método descrito en el presente texto.

45 En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica hasta al menos alrededor de un 95%, al menos alrededor de un 98%, al menos alrededor de un 99%, al menos alrededor de un 99,5%, al menos alrededor de un 99,6%, al menos alrededor de un 99,7%, al menos alrededor de un 99,8%, o al menos alrededor de un 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes métodos: 'Western blot' de las proteínas de células huésped (HCP), SDS-PAGE con tinción de Coomassie, SDS-PAGE con tinción con plata, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión de tamaño.

50 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye preparar o formular la arilsulfatasa A purificada. El tampón utilizado para preparar la arilsulfatasa A purificada puede incluir, por ejemplo, cloruro de sodio.

55 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para purificar arilsulfatasa A de una muestra, de manera que el método incluye, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A (por ejemplo, arilsulfatasa A recombinante), y someter la muestra a una cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico que se describe en el presente texto.

60 En una realización, la cromatografía de intercambio catiónico incluye una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP). En otra realización, la cromatografía de intercambio catiónico es un paso o método de pulido. La cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo -SP-) puede realizarse utilizando, por ejemplo, uno o más de los siguientes: TOYOPEARL® SP-650, TOYOPEARL® SP-550, TSKGEL® SP-3PW, TSKGEL® SP-5PW, SP SEPHAROSE™ Fast Flow ('Flujo rápido'), SP SEPHAROSE™ High Performance ('Alto rendimiento'), SP SEPHAROSE™ XL, membrana de SARTOBIND® S, POROS® HS50, UNOSPHERE™ S y MACROCAP™ S.

En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico incluye: cargar la muestra de arilsulfatasa A en una columna de cromatografía catiónica (por ejemplo, una columna de intercambio catiónico con sulfopropilo -SP-), lavar la columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir la arilsulfatasa A de la columna.

5

En algunas realizaciones, para cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se utiliza un tampón de carga. En una realización, el tampón de carga contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 25 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 20 mM, por ejemplo, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 15 mM o alrededor de 20 mM. En otra realización, el tampón de lavado contiene acetato de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de acetato de sodio de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 20 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 60 mM.

10

15

En algunas realizaciones, el proceso de carga de la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un pH de entre alrededor de 3,0 y alrededor de 6,0, por ejemplo, de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 5,0, por ejemplo, de alrededor de 4,0, alrededor de 4,3 o alrededor de 4,5.

20

En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se carga en la columna de cromatografía de intercambio catiónico con una capacidad de enlace o capacidad de unión de alrededor de 15 AU/L de resina o menos, por ejemplo, alrededor de 14 AU/L de resina o menos, o alrededor de 12 AU/L de resina o menos, por ejemplo, entre alrededor de 10 AU/L de resina y alrededor de 14 AU/L de resina, o entre alrededor de 10 AU/L de resina y alrededor de 12 AU/L de resina.

25

En algunas realizaciones, el proceso para lavar la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con uno o más tampones de lavado. Por ejemplo, el lavado de la columna de intercambio catiónico puede incluir uno o más (por ejemplo, un primer y un segundo) pasos de lavado, de manera que cada uno utiliza un tampón de lavado diferente.

30

En una realización, el tampón de lavado contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 25 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 20 mM, o de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 15 mM, por ejemplo, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 15 mM o alrededor de 20 mM. En otra realización, el tampón de lavado contiene acetato de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de acetato de sodio de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 20 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 60 mM.

35

40

En algunas realizaciones, el proceso de lavado de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un pH de entre alrededor de 3,0 y alrededor de 6,0, por ejemplo, de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 5,0, por ejemplo, de alrededor de 4,0, alrededor de 4,3 o alrededor de 4,5.

45

En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se utiliza un tampón de elución.

50

En una realización, el tampón de elución contiene cloruro de sodio. Por ejemplo, el tampón de elución tiene una concentración de cloruro de sodio de entre alrededor de 25 mM y alrededor de 75 mM, por ejemplo, de entre alrededor de 45 mM y alrededor de 60 mM, por ejemplo, de alrededor de 45 mM, alrededor de 50 mM, alrededor de 55 mM o alrededor de 60 mM. En otra realización, el tampón de lavado contiene acetato de sodio. Por ejemplo, el tampón de carga tiene una concentración de acetato de sodio de entre alrededor de 10 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, de alrededor de 20 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 60 mM.

55

En algunas realizaciones, para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se utiliza un pH de entre alrededor de 3,0 y alrededor de 6,0, por ejemplo, de entre alrededor de 4,0 y alrededor de 5,0, por ejemplo, de alrededor de 4,0, alrededor de 4,3 o alrededor de 4,5.

60

En algunas realizaciones, el proceso para eluir la arilsulfatasa A de la columna de cromatografía de intercambio catiónico incluye uno o más pasos de recogida en el pico de elución ('elution peak collection', en inglés). Por ejemplo, la recogida en el pico de elución comienza desde alrededor de 50 mAU (o mUA) en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, por ejemplo, desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 200 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 50 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, desde alrededor de 50 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 200 mAU en el lado descendente, o desde alrededor de 100 mAU en el lado ascendente hasta alrededor de 100 mAU en el lado descendente, por ejemplo, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

65

El tampón de carga, el tampón de lavado y el tampón de elución que se describen en el presente texto pueden incluir uno o más agentes amortiguadores. Por ejemplo, el agente amortiguador puede ser TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, SSC, MES, fosfato de sodio, acetato de sodio, o una combinación de estos compuestos. El agente amortiguador tiene una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 500 mM, por ejemplo, de entre  
5 alrededor de 10 mM y alrededor de 250 mM, de entre alrededor de 20 mM y alrededor de 100 mM, de entre alrededor de 1 mM y 5 mM, de entre alrededor de 5 mM y 10 mM, de entre alrededor de 10 mM y 50 mM, o de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, por ejemplo, alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM o alrededor de 50 mM.

En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una temperatura de alrededor de 23° C o menos, alrededor de 18° C o menos, o  
10 alrededor de 16° C o menos, por ejemplo, alrededor de 23° C, alrededor de 20° C, alrededor de 18° C o alrededor de 16° C. En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una temperatura de entre alrededor de 23° C y alrededor de 16° C, por ejemplo,  
15 alrededor de 23° C, alrededor de 20° C, alrededor de 18° C o alrededor de 16° C, y para cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se utiliza un pH de entre alrededor de 4,5 y alrededor de 4,3, por ejemplo, de alrededor de 4,5, alrededor de 4,4 o alrededor de 4,3. En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a alrededor de 23° C y el proceso de cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio  
20 catiónico se realiza con un pH de alrededor de 4,5. En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a alrededor de 23° C y el proceso de cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un pH de alrededor de 4,3. En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a alrededor de 18° C y el proceso de cargar la muestra de arilsulfatasa A en la  
25 columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un pH de alrededor de 4,5. En algunas realizaciones, el proceso de someter la muestra de arilsulfatasa A a la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a alrededor de 18° C y el proceso de cargar la muestra de arilsulfatasa A en la columna de cromatografía de intercambio catiónico se realiza con un pH de alrededor de 4,3.

En una realización, la arilsulfatasa A se depura a pequeña escala o escala de laboratorio. En otra  
30 realización, la arilsulfatasa A se depura a escala de fabricación.

En algunas realizaciones, el rendimiento de la actividad de la arilsulfatasa A es de al menos alrededor de un  
35 75%, por ejemplo, al menos alrededor de un 80%, por ejemplo, entre alrededor de un 80% y alrededor de un 105%.

En algunas realizaciones, el rendimiento proteico (UA, Unidades de Absorbancia o AU, por sus siglas en  
inglés) es de entre alrededor del 65% y alrededor del 100%, por ejemplo, de entre alrededor del 70% y alrededor del  
95%, tal y como se determina mediante una espectrofotometría, por ejemplo, a 280 nm.

En algunas realizaciones, el valor de reducción logarítmica (LRV) de las proteínas de células huésped  
40 (HCP) es de entre alrededor de 1,0 y alrededor de 2,5, por ejemplo, entre alrededor de 1,5 y alrededor de 2,0, o entre alrededor de 1,7 y alrededor de 1,9.

La actividad específica de la arilsulfatasa A purificada puede ser de -al menos- entre alrededor de 50 U/mg  
45 y alrededor de 140 U/mg, por ejemplo, al menos alrededor de 70 U/mg, al menos alrededor de 90 U/mg, al menos alrededor de 100 U/mg, o al menos alrededor de 120 U/mg, por ejemplo, tal y como se determina mediante un método descrito en el presente texto.

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica hasta al menos alrededor de un 95%, al menos  
50 alrededor de un 98%, al menos alrededor de un 99%, al menos alrededor de un 99,5%, al menos alrededor de un 99,6%, al menos alrededor de un 99,7%, al menos alrededor de un 99,8% o al menos alrededor de un 99,9%. La pureza de la arilsulfatasa A puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de los siguientes métodos: 'Western blot' de las proteínas de células huésped (HCP), SDS-PAGE con tinción de Coomassie, SDS-PAGE con tinción con plata, HPLC de fase inversa y HPLC de exclusión de tamaño.

En algunas realizaciones, el método incluye, adicionalmente, recoger la muestra de arilsulfatasa A, por  
55 ejemplo, mediante un método que incluye ultrafiltración de flujo tangencial.

En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una  
60 filtración en profundidad, por ejemplo, usando un filtro de profundidad ZETA PLUS®.

En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una  
inactivación viral, por ejemplo, poniendo en contacto la arilsulfatasa A con un disolvente o un detergente. El disolvente o detergente puede incluir, por ejemplo, polisorbato 80, Tri-n-Butil-Fosfato (TnBP) o ambos.

En algunos métodos de la presente invención, adicionalmente el método incluye someter la muestra de

arilsulfatasa a una cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, una cromatografía de intercambio aniónico de aminas cuaternarias, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra de arilsulfatasa A se somete a la cromatografía de intercambio aniónico previamente a la cromatografía de intercambio catiónico.

5 En algunos métodos de la presente invención, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto, por ejemplo, una cromatografía de HA, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. Por ejemplo, la cromatografía en modo mixto puede incluir una cromatografía de hidroxapatita cerámica. En algunas realizaciones, la muestra se somete a la cromatografía en modo mixto  
10 previamente a la cromatografía de intercambio catiónico.

15 En algunos métodos de la presente invención, adicionalmente el método incluye someter la muestra a una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), como una HIC que incluya una cromatografía de fenilo, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. En algunas realizaciones, la muestra se somete a la HIC previamente a la cromatografía de intercambio catiónico.

20 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye concentrar la arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante ultrafiltración, diafiltración o ambas. En algunas realizaciones, el proceso de concentrar la arilsulfatasa A incluye ultrafiltración de flujo tangencial.

25 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una filtración para eliminar virus, por ejemplo, utilizando un filtro PLANOVA™.

30 En algunas realizaciones, adicionalmente el método incluye preparar o formular la arilsulfatasa A purificada. El tampón utilizado para preparar la arilsulfatasa A purificada puede incluir, por ejemplo, cloruro de sodio.

35 En algunas realizaciones, el método para purificar la arilsulfatasa A de una muestra incluye proporcionar una muestra de arilsulfatasa A; someter la muestra de arilsulfatasa A a una primera cromatografía de intercambio iónico; someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto; someter la muestra de arilsulfatasa A a una cromatografía de interacción hidrofóbica, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto; y someter la muestra de arilsulfatasa A a una segunda cromatografía de intercambio iónico. La primera cromatografía de intercambio iónico incluye una cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto. La segunda cromatografía de intercambio iónico puede incluir una cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto, como una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP).

40 En una realización, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una filtración en profundidad, por ejemplo, una filtración en profundidad que se describe en el presente texto. En otra realización, el método incluye, además, someter la muestra de arilsulfatasa A a una inactivación viral, por ejemplo, un método de inactivación viral que se describe en el presente texto.

45 En otra realización, el método incluye, además, concentrar la arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante un método que se describe en el presente texto, y en otra realización, el método incluye, además, someter el producto de la arilsulfatasa A a una filtración para eliminar virus, por ejemplo, mediante un método que se describe en el presente texto.

En otra realización, el método incluye, además, preparar o formular la arilsulfatasa A purificada.

50 En un aspecto, la divulgación presenta un método para purificar arilsulfatasa a de una muestra, de manera que el método incluye, por ejemplo, proporcionar una muestra de arilsulfatasa A; someter la muestra de arilsulfatasa A a una primera cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, una cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto) para obtener una muestra de cromatografía de intercambio iónico de arilsulfatasa A; someter la muestra de cromatografía de intercambio iónico de arilsulfatasa A a una cromatografía en modo mixto, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto, para obtener una muestra de cromatografía en modo mixto de arilsulfatasa A; someter la muestra de cromatografía en modo mixto de arilsulfatasa A a una cromatografía de interacción hidrofóbica, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto, para obtener una muestra de cromatografía de interacción hidrofóbica de arilsulfatasa A; y someter la muestra de cromatografía de interacción hidrofóbica de arilsulfatasa A a una segunda cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, una cromatografía de intercambio catiónico, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto).

60 En algunas realizaciones, la primera cromatografía de intercambio iónico comprende una cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto; y la segunda cromatografía de intercambio iónico incluye una cromatografía de intercambio catiónico -por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto- como la cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP) que se describe en el presente texto.

65

En una realización, adicionalmente el método incluye someter la muestra de arilsulfatasa A a una filtración en profundidad, por ejemplo, mediante un método que se describe en el presente texto. En otra realización, adicionalmente el método comprende someter la muestra a inactivación viral, por ejemplo, mediante un método que se describe en el presente texto.

En una realización, adicionalmente el método incluye concentrar la arilsulfatasa A, por ejemplo, mediante un método que se describe en el presente texto. En otra realización, el método incluye someter el producto de la arilsulfatasa A a una filtración para eliminar virus, por ejemplo, mediante un método que se describe en el presente texto.

En otra realización, adicionalmente el método incluye preparar o formular la arilsulfatasa A purificada.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para preparar o formular arilsulfatasa A purificada por medio de un método descrito en el presente texto. Por ejemplo, la arilsulfatasa A purificada se prepara para administrarse directamente al sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés), por ejemplo, por vía intratecal o intracerebral, o para administrarse por otros medios, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), o ambas, ya sea de manera simultánea, de manera secuencial o de cualquier otra forma combinada, de acuerdo con un paradigma de tratamiento determinado por un médico para cada paciente, con el objetivo de tratar una enfermedad que se describe en el presente texto, por ejemplo, la leucodistrofia metacromática (MLD).

En otro aspecto, la divulgación presenta una composición farmacéutica que contiene arilsulfatasa A purificada por medio de un método descrito en el presente texto, por ejemplo, para administrarse directamente al sistema nervioso central (CNS), por ejemplo, por vía intratecal o intracerebral, o para administrarse por otros medios, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), o ambas, ya sea de manera simultánea, de manera secuencial o de cualquier otra forma combinada, de acuerdo con un paradigma de tratamiento determinado por un médico para cada paciente, con el objetivo de tratar una enfermedad que se describe en el presente texto, por ejemplo, la leucodistrofia metacromática (MLD).

En otro aspecto, la divulgación presenta el uso de una composición que contiene arilsulfatasa A purificada por medio de un método descrito en el presente texto, por ejemplo, para administrarse directamente al sistema nervioso central (CNS), por ejemplo, por vía intratecal o intracerebral, o para administrarse por otros medios, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), o ambas, ya sea de manera simultánea, de manera secuencial o de cualquier otra forma combinada, de acuerdo con un paradigma de tratamiento determinado por un médico para cada paciente, con el objetivo de tratar una enfermedad que se describe en el presente texto, por ejemplo, la leucodistrofia metacromática (MLD).

En otro aspecto, la invención presenta un método para administrar una composición farmacéutica que contiene arilsulfatasa A purificada por medio de un método que se describe en el presente texto, por ejemplo, para tratar una enfermedad que se describe en el presente texto, por ejemplo, la leucodistrofia metacromática (MLD).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### Arilsulfatasa A

La arilsulfatasa A (ASA, ARSA o cerebrósido-sulfatasa) es una enzima que descompone el cerebrósido 3-sulfato (o sulfátido) en cerebrósido y sulfato. Más específicamente, el galactosil sulfátido se metaboliza normalmente mediante la hidrólisis del enlace o ligamiento ('linkage', en inglés) del 3-O-sulfato para formar galactocerebrósido por medio de la acción combinada de la enzima lisosómica arilsulfatasa A (EC 3.1.6.8) (Austin et al. *Biochem J.*; 1964, 93, 15C-17C) y una proteína activadora de esfingolípidos llamada saposina B. La deficiencia de arilsulfatasa A se da en todos los tejidos de pacientes que presentan la forma infantil tardía, juvenil y adulta de la leucodistrofia metacromática (MLD). Tal y como se utilizan en el presente texto, la proteína arilsulfatasa A se denominará 'ASA' o 'ARSA' y la saposina B se denominará 'Sap-B'.

La arilsulfatasa A es una glicoproteína ácida con un punto isoelectrónico bajo. Por encima de un pH de 6.5, la enzima existe como un monómero con un peso molecular aproximado de 100 kDa. La arilsulfatasa A experimenta una polimerización dependiente del pH y forma un dímero en un pH de 4.5. En la orina humana, la enzima se compone de dos subunidades no idénticas de 63 y 54 kDa (Laidler PM et al. *Biochim Biophys Acta.* 1985, 827, 73-83). La arilsulfatasa A purificada del hígado humano, la placenta y los fibroblastos también se compone de dos subunidades cuyo tamaño es ligeramente diferente y varía entre 55 y 64 kDa (Draper RK et al. *Arch Biochemica Biophys.* 1976, 177, 525-538; Waheed A et al. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1982, 363, 425-430; Fujii T et al. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 15 1122, 93-98). Como en el caso de otras enzimas lisosómicas, la arilsulfatasa A se sintetiza en los ribosomas ligados a las membranas como un precursor glicosilado. Después, pasa a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, donde sus oligosacáridos N-enlazados ('N-linked', en inglés) se procesan con la formación de oligosacáridos fosforilados y sulfatados de tipo complejo (Waheed A et al. *Biochim Biophys Acta.* 1985, 847, 53-61; Braulke T et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987, 143, 178-185). En los fibroblastos cultivados normalmente, se produce un polipéptido precursor de 62 kDa, que se desplaza mediante la

unión a un receptor de manosa-6-fosfato (Braulke T et al. *J Biol Chem.* 1990, 265, 6650-6655) a un endosoma prelisosómico ácido (Kelly BM et al. *Eur J Cell Biol.* 1989, 48, 71-78).

Los métodos que se describen en el presente texto pueden usarse para purificar arilsulfatasa A de cualquier fuente, por ejemplo, de tejidos o células cultivadas (por ejemplo, células humanas -por ejemplo, fibroblastos- que producen arilsulfatasa A de forma recombinante). Mediante los métodos que se describen en el presente texto, puede producirse arilsulfatasa A de cualquier origen, incluyendo -pero sin limitarse a- humanos y otros animales, como mamíferos.

La longitud (18 aminoácidos) del péptido señal de la arilsulfatasa A humana se basa en la secuencia de consenso y en un sitio de procesamiento específico para una secuencia de señal. Por lo tanto, desde el ADNc de ASA humana (EMBL GenBank; números de acceso J04593 y X521151) la escisión del péptido señal se da en todas las células tras el número de residuo 18 (Ala), lo que produce una forma madura de arilsulfatasa A humana. Tal y como se utiliza en el presente texto, la arilsulfatasa A recombinante se abreviará como 'rASA'. La forma madura de arilsulfatasa A, incluyendo la forma madura de arilsulfatasa A humana, se denominará 'mASA' y la ASA humana recombinante madura se denominará 'mrhASA'.

Se ha probado la existencia de múltiples formas de arilsulfatasa A mediante la electroforesis y el enfoque isoeléctrico de preparaciones enzimáticas a partir de orina humana (Luijten JAFM et al. *J Mol Med.* 1978, 3, 213), leucocitos (Dubois et al. *Biomedicine.* 1975, 23, 116-119; Manowicz P et al. *Biochem Med Metab Biol.* 1988, 39, 117-120), plaquetas (Poretz et al. *Biochem J.* 1992, 287, 979-983), fibroblastos cultivados (Waheed A et al. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1982, 363, 425-430; Stevens RL et al. *Biochim Biophys Acta.* 1976, 445, 661-671; Farrell DF et al. *Neurology.* 1979, 29, 16-20) e hígado (Stevens RL et al. *Biochim Biophys Acta.* 1976, 445, 661-671; Farrell DF et al. *Neurology.* 1979, 29, 16-20; Sarafian TA et al. *Biochem Med.* 1985, 33, 372-380). El tratamiento con endoglicosidasa H, sialidasa y fosfatasa alcalina reduce el tamaño molecular y la complejidad del patrón electroforético, lo que sugiere que gran parte de la heterogeneidad de carga de la arilsulfatasa A se debe a variaciones en el contenido de carbohidratos de la enzima.

El sitio activo de la arilsulfatasa A contiene un residuo de histidina esencial (Lee GD y Van Etten, *Arch Biochem Biophys.* 1975, 171, 424-434) y dos o más residuos de arginina (James GT, *Arch Biochem Biophys.* 1979, 97, 57-62). Muchos aniones son inhibidores de la enzima en concentraciones de nivel milimolar o inferiores.

Se ha identificado una modificación proteica en dos sulfatasas eucariotas (arilsulfatasa A y arilsulfatasa B -ASB-) y en el alga verde *Volvox carteri* (Schmidt B et al. *Cell.* 1995, 82, 271-278; Selmer T et al. *Eur J Biochem.* 1996, 238, 341-345). Esta modificación provoca la conversión de un residuo de cisteína -que se mantiene entre las sulfatasas conocidas- en un residuo de ácido 2-amino-3-oxopropiónico (Schmidt B et al. *Cell.* 1995, 82, 271-278). El nuevo derivado o derivativo de aminoácidos también se conoce como C-formilglicina (FGly). En la arilsulfatasa A y la arilsulfatasa B derivadas de células con MSD (Deficiencia múltiple de sulfatasa), se conserva el residuo de Cys-69. Por consiguiente, se sugiere que la conversión de la Cys-69 en FGly-69 es necesaria para producir arilsulfatasa A y arilsulfatasa B catalíticamente activas, y que la deficiencia de esta modificación proteica es la causa de la MSD. La Cys-69 se remite al precursor arilsulfatasa A, que tiene un péptido señal de 18 residuos. En la arilsulfatasa A madura (mASA), el mencionado residuo de cisteína es Cys-51.

Otras investigaciones han demostrado que una secuencia lineal de 16 residuos en los alrededores de la Cys-51 en la arilsulfatasa A madura es suficiente para dirigir la conversión y que la modificación proteica sucede después de o en una etapa tardía de la translocación de la proteína co-traducciona al retículo endoplasmático cuando el polipéptido todavía no está plegado y no ha adquirido su estructura nativa (Dierks T et al. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, 94, 1193-1196; Wittke, D et al. (2004), *Acta Neuropathol.* (Berl.), 108, 261-271).

Se ha descrito la estructura del gen de la arilsulfatasa A humana. Tal y como se utiliza en el presente texto, este gen se denominará 'ARSA'. Sin embargo, en algunos casos 'ARSA' también puede hacer referencia a la proteína arilsulfatasa A. El gen ARSA se encuentra cerca del extremo del brazo largo del cromosoma 22 (22q13.31 -qter), abarca 3,2 kb (Kreysing et al. *Eur J Biochem.* 1990, 191, 627-631) y se compone de ocho exones que especifican la unidad enzimática del aminoácido 507 (Stein et al. *J Biol Chem.* 1989, 264, 1252-1259). Se han detectado ARNs mensajeros de 2,1, 3,7 y 4,8 kb en células de fibroblastos, de manera que, aparentemente, el mensaje de 2,1 kb es el responsable de la mayor parte de la arilsulfatasa A activa generada por la célula (Kreysing et al. *Eur J Biochem.* 1990, 191, 627-631). La secuencia del ARSA se ha depositado en el GenBank (banco genético) del EMBL con el número de acceso X521150. Las diferencias entre el ADNc publicado y la parte de codificación del ARSA fueron descritas por Kreysing et al. (*Eur J Biochem.* 1990, 191, 627-631). La secuencia de ADNc descrita originalmente por Stein et al. (*J Biol Chem.* 1989, 264, 1252-1259) y la secuencia de ADNc descrita por Kreysing et al. (*Eur J Biochem.* 1990, 191, 627-631) se han depositado en el GenBank del EMBL con los siguientes números de acceso: J04593 y X521151, respectivamente.

Se han identificado diversos polimorfismos y más de 40 mutaciones relacionadas con enfermedades en el gen ARSA (Gieselmann et al. *Hum Mutat.* 1994, 4, 233-242; Barth et al. *Hum Mutat.* 1995, 6, 170-176; Draghia et al. *Hum Mutat.* 1997, 9, 234-242). Las mutaciones relacionadas con enfermedades presentes en el gen ARSA pueden

clasificarse en dos grupos amplios que se correlacionan razonablemente bien con el fenotipo clínico de la MLD. Un grupo (I) no produce ninguna enzima activa ni ninguna proteína inmunorreactiva, y tampoco expresa ninguna actividad de ASA cuando se introduce en líneas celulares animales de cultivo. El otro grupo (A) genera pequeñas cantidades de material de reacción cruzada y bajos niveles de enzimas funcionales en células cultivadas. Los individuos que son homocigóticos con respecto a una mutación del grupo (I), o que tienen dos mutaciones diferentes de este grupo, muestran MLD infantil de aparición tardía. La mayoría de individuos con una mutación del grupo (I) y una mutación del grupo (A) desarrollan la forma juvenil, mientras que aquellos con dos mutaciones del grupo (A) normalmente manifiestan la MLD adulta. Algunas de estas mutaciones se han hallado con relativa frecuencia, mientras que otras solo se han detectado en una familia. Es posible buscar el origen de mutaciones específicas a través de los miembros de muchas familias; sin embargo, la detección general de los portadores todavía no es factible.

Además de las mutaciones relacionadas con enfermedades que se han descrito previamente, se han identificado diversos polimorfismos en el gen ARSA. Se ha hallado una actividad extremadamente baja de ASA en algunos padres y madres -clínicamente normales- de pacientes con MLD y también en la población general. Esta supuesta pseudodeficiencia de ASA se ha relacionado con un polimorfismo habitual del gen ARSA (Gieselmann et al. Dev Neurosci. 1991, 13, 222-227).

#### Purificación de arilsulfatasa A

Tal y como se utiliza en el presente texto, un 'contaminante' es un material que es diferente al producto de polipéptidos deseado, por ejemplo, arilsulfatasa A (ASA). El contaminante puede ser una variante o variedad del polipéptido deseado (por ejemplo, una variedad sin amidas o una variedad de amino-aspartato del polipéptido deseado) u otra molécula, por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico o una endotoxina.

Tal y como se utiliza en el presente texto, cuando se 'purifica' (o se 'depura') un polipéptido de una muestra o composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes, quiere decirse que se aumenta el grado de pureza del polipéptido en la muestra o composición eliminando (completa o parcialmente) al menos un contaminante de la muestra o composición. Puede haber un 'paso o proceso de purificación' que forme parte del proceso general de purificación (o depuración), de manera que se produzca una composición que comprende al menos en torno a un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9% de peso del polipéptido de interés, tomando en cuenta el peso total de la composición.

El reactivo o material de partida para el proceso de purificación puede provenir de cualquier fuente, por ejemplo, un tejido o un extracto celular crudo. Normalmente, la ASA es secretada por las células y, posteriormente, se purifica del sobrenadante del cultivo celular.

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir -pero no se limitan a- uno o más de los siguientes pasos: filtración en profundidad (o filtración profunda), inactivación viral, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico), cromatografía en modo mixto, cromatografía de interacción hidrofóbica, ultrafiltración/diafiltración y filtración para eliminar virus (o filtración de eliminación vírica).

En los pasos del proceso de cromatografía, el volumen de resina adecuado que se ha de usar en una columna de cromatografía se deduce a partir de las dimensiones de la columna, esto es, el diámetro de la columna y la altura de la resina, y varía dependiendo de -por ejemplo- la cantidad de proteína presente en la solución aplicada y la capacidad de enlace de la resina utilizada. Sin embargo, está dentro del alcance de la presente divulgación aumentar la escala del proceso de producción, así como del proceso de purificación, para lograr una producción y una purificación de ASA a escala industrial.

Por consiguiente, algunos parámetros como el tamaño, el diámetro y la tasa de flujo de la columna pueden aumentarse para que se ajusten a la velocidad y la eficiencia de una producción a tan grande escala. En algunas realizaciones, el diámetro de la columna es de entre 50 y 100 mm, el volumen es de entre 100 y 300 ml y la tasa de flujo es de entre 40 y 400 cm/hora (por ejemplo, entre alrededor de 100 cm/hora y 150 cm/hora) o de entre alrededor de 5 y 100 ml.

#### ***Filtración en profundidad***

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de filtración en profundidad (o filtración profunda). Los filtros de profundidad son una variedad de filtros que utilizan un medio de filtración poroso para retener partículas a lo largo de todo el medio, y no solo en la superficie del medio. Estos filtros se usan habitualmente cuando el fluido que se va a filtrar contiene una alta carga de partículas puesto que, en relación con otros tipos de filtros, pueden retener una gran masa de partículas antes de quedar obstruidos. Un ejemplo de filtro de profundidad es el filtro de profundidad ZETA PLUS®.

**Inactivación viral**

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de inactivación viral.

Debe entenderse que estos métodos pretenden dar origen a una preparación de una enzima, que está básicamente libre de virus infecciosos y que puede denominarse 'producto libre de virus'. Además, se contempla el hecho de que los diversos métodos puedan usarse independientemente o de forma conjunta.

La inactivación viral (o inactivación vírica) puede conseguirse mediante la adición de uno o más 'agentes inactivadores de virus' a una solución que contiene la enzima. Normalmente, el paso para inactivar virus se realizará antes de los pasos de purificación cromatográfica para garantizar que el agente no está presente en el producto final en cualquier cantidad o concentración que puedan comprometer la seguridad del producto cuando este se utilice como un producto farmacéutico o cuando el producto se utilice para la preparación de un producto farmacéutico. El término 'agente inactivador de virus' pretende denotar aquellos agentes o métodos que pueden utilizarse para inactivar o desactivar los virus con envoltura lipídica, así como los virus sin envoltura lipídica. Debe entenderse que el término 'agente inactivador de virus' abarca tanto una combinación de estos agentes y/o métodos, siempre y cuando sea adecuada, como solo un tipo de estos agentes o métodos.

Habitualmente, los agentes inactivadores de virus son detergentes y/o disolventes y, más habitualmente, mezclas de detergente-disolvente. Debe entenderse que, opcionalmente, el agente inactivador de virus es una mezcla de uno o más detergentes con uno o más disolventes. Para la inactivación de virus puede usarse una gran variedad de detergentes y disolventes. El detergente puede seleccionarse de un grupo que se compone de detergentes iónicos y no iónicos y se selecciona para que sea básicamente no desnaturizante. Normalmente, se utiliza un detergente no iónico, ya que facilita la posterior eliminación del detergente de la preparación de rASA en los pasos de purificación posteriores. Algunos detergentes adecuados son descritos, por ejemplo, por Shanbrom et al. en la Patente de EE UU 4,314,997 y en la Patente de EE UU 4,315,919. Los detergentes habituales se venden con las marcas registradas Triton X-100 y Tween 20 o Tween 80. Los disolventes preferidos para su uso como agentes inactivadores de virus son di- o tri-alkilfosfatos, tal y como lo explican, por ejemplo, Neurath y Horowitz en la Patente de EE UU 4,764,369. El tri(n-butil) fosfato (TnBP) es un disolvente habitual. Un agente inactivador de virus especialmente preferido para la práctica de la presente invención es el Tween 80, pero, de forma alternativa, pueden usarse otros agentes o combinaciones de agentes. Normalmente, el agente se añade en un volumen tal que la concentración de Tween-80 en la solución que contiene ASA es de entre alrededor de un 0,5 y un 4,0% en peso, preferiblemente, una concentración de alrededor del 1% en peso. Después, puede añadirse TnBP para obtener una concentración final de 0,3%, que se calcula basándose en el nuevo volumen de la muestra que contiene ASA.

El paso de inactivación de virus se desarrolla en unas condiciones que inactivan los virus envueltos, lo que da como resultado una solución que contiene una rASA básicamente libre de virus. En general, dichas condiciones incluyen una temperatura de 4-37° C, como 19-28° C, 23-27° C y, normalmente, alrededor de 25° C, y un tiempo de incubación que los estudios de validación estiman efectivo. Normalmente, es suficiente un tiempo de incubación de 1-24 horas, preferiblemente 10-18 horas, por ejemplo alrededor de 14 horas, para garantizar una inactivación viral suficiente. Sin embargo, las condiciones adecuadas (temperatura y tiempos de incubación) dependen del agente inactivador de virus utilizado, el pH, la concentración de proteínas y el contenido de lípidos de la solución.

Se contempla el hecho de que también se puedan utilizar otros métodos para eliminar o inactivar virus con el objetivo de producir un producto libre de virus; por ejemplo, la adición de metileno azul y la posterior inactivación mediante radiación con luz ultravioleta.

**Cromatografía de intercambio iónico**

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico).

Las personas versadas en la materia sabrán que los intercambiadores de iones o intercambiadores iónicos (por ejemplo, intercambiadores de aniones y/o intercambiadores de cationes) pueden estar basados en diversos materiales en relación con la matriz y los grupos cargados unidos a ella. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes matrices, en las que los materiales mencionados pueden estar más o menos entrelazados o reticulados: basadas en la agarosa (como SEPHAROSE™ (Sefarosa) CL- 6B, SEPHAROSE™ Fast Flow y S SEPHAROSE™ High Performance), basadas en la celulosa (como DEAE SEPHACEL®), basadas en el dextrano (como SEPHADEX®), basadas en el sílice y basadas en los polímeros sintéticos.

La resina de intercambio iónico puede prepararse siguiendo métodos conocidos. Normalmente, puede pasarse un tampón o 'buffer' de equilibrio -que permite que la resina se una a sus contra-iones- a través de la resina de intercambio iónico antes de cargar en la resina la muestra o composición que contiene el polipéptido y uno o más contaminantes. Convenientemente, el tampón de equilibrio puede ser el mismo que el tampón de carga, pero esto no es necesario.

En una realización opcional de la invención, la resina de intercambio iónico puede regenerarse con un tampón de regeneración después de la elución del polipéptido y, de este modo, la columna puede reutilizarse. Normalmente, el nivel de la concentración de sales y/o del pH del tampón de regeneración puede ser tal que básicamente todos los contaminantes y el polipéptido de interés se eluyan de la resina de intercambio iónico. Normalmente, el tampón de regeneración tiene una concentración de sal muy elevada para eluir los contaminantes y polipéptidos de la resina de intercambio iónico.

#### *Cromatografía de intercambio aniónico*

En el caso de la resina de intercambio aniónico, los grupos cargados que están unidos covalentemente a la matriz pueden ser, por ejemplo, dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y/o amonio cuaternario (Q). En algunas realizaciones, la resina de intercambio aniónico empleada es una columna de Q Sefarosa y, más habitualmente, puede ser Q SEPHAROSE™ Fast Flow, Q SEPHAROSE™ High Performance o una columna de Q SEPHAROSE™ XL, pero también pueden usarse otros intercambiadores de aniones.

La solución acuosa que contiene la ASA y el (los) contaminante(s) puede cargarse en la resina aniónica usando un tampón de carga que tiene una concentración de sal y/o un pH tales que el polipéptido y el contaminante se unen a la resina de intercambio aniónico. Posteriormente, la resina puede lavarse con uno o más volúmenes de columna de un tampón de carga, seguidos de uno o más volúmenes de columna de un tampón de lavado, aumentando así la concentración de sales. Finalmente, la ASA puede eluirse aumentando aún más la concentración de sales. De manera opcional, la elución de la enzima también puede regularse disminuyendo el pH de manera gradual o escalonada. Las partes o fracciones que contienen actividad de ASA pueden recogerse y combinarse para obtener una mayor purificación.

Para una persona con conocimientos y habilidades ordinarios en este campo, resultará evidente que pueden utilizarse numerosos y diversos tampones en los pasos de carga, lavado y elución. Sin embargo, normalmente la columna puede equilibrarse con 1-10 lavados de la misma usando un tampón que tiene 0,05 M de MES-Tris y un pH de 7.0. Según convenga, la muestra puede cargarse en el tampón del paso previo del proceso de purificación, o bien la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. La columna puede lavarse con 1-10 volúmenes de columna del tampón utilizado para equilibrar, seguidos de un tampón de lavado que contiene 0,02 M de MES-Tris, 0,12 M de NaCl y un pH de 7.0. De forma alternativa, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualesquiera otros tampones de equilibrio, carga y lavado descritos en el presente texto y utilizados en cromatografías de intercambio aniónico. La muestra puede eluirse en un tampón que contiene 0,02 de MES-Tris, 0,26 M de NaCl y un pH de 7.0. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en el presente texto y utilizado en cromatografías de intercambio aniónico.

#### *Cromatografía de intercambio catiónico*

En una realización habitual, la cromatografía de intercambio catiónico comprende una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP), pero pueden usarse otras membranas o resinas de cromatografía catiónica, por ejemplo, una membrana de MUSTANG™ S, una resina de S- SEPHAROSE™ o una resina de SEPHAROSE™ azul.

En algunas realizaciones, la cromatografía de intercambio catiónico se usa como paso o método de pulido.

La solución acuosa que contiene la arilsulfatasa A y el (los) contaminante(s) puede cargarse en la resina catiónica usando un tampón de carga que tiene una concentración de sal y/o un pH tales que el polipéptido y el contaminante se unen a la resina de intercambio catiónico. Posteriormente, la resina puede lavarse con uno o más volúmenes de columna de un tampón de carga o un tampón de equilibrio, seguidos -opcionalmente- de uno o más volúmenes de columna de un tampón de lavado, aumentando así la concentración de sales. Finalmente, la arilsulfatasa A puede eluirse en un tampón de elución. Las partes o fracciones que contienen actividad de arilsulfatasa A pueden recogerse y combinarse para obtener una mayor purificación.

En una realización habitual, la concentración de NaCl y/o el pH del tampón de carga, el tampón de lavado y/o el tampón de elución pueden optimizarse, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto, para aumentar o mejorar la unión con el (los) objetivo(s) y/o disminuir la unión con las impurezas. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en el tampón de carga es de alrededor de 20 mM, 15 mM, 10 mM o menos. En algunas realizaciones, el tampón de carga tiene un pH de alrededor de 4,5, 4,3, 4,0 o menos. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en el tampón de lavado es de alrededor de 20 mM, 15 mM, 10 mM o menos. En algunas realizaciones, la concentración de NaCl en el tampón de elución es de alrededor de 55 mM, 50 mM, 45 mM, 40 mM o menos.

En algunas realizaciones, las columnas pueden equilibrarse con más de 3, por ejemplo, 5 ó 10 volúmenes de columna de 0,01 M de NaAc, 0,01 M de NaCl, 0,03 M de ácido acético y un pH de 4.2. En algunas realizaciones, la muestra puede cargarse en el tampón del paso previo del proceso de purificación, o bien la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. La columna puede lavarse con 1-10 volúmenes de columna del tampón

utilizado para equilibrar. De forma alternativa, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualesquiera otros tampones de equilibrio, carga y lavado descritos en el presente texto y utilizados en cromatografías de intercambio catiónico. La muestra puede eluirse en un tampón que contiene 0,02 M de NaAc, 0,05 M de NaCl y un pH de 4.5. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en el presente texto y utilizado en cromatografías de intercambio catiónico.

En otra realización habitual, la cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse con una temperatura optimizada, por ejemplo, tal y como se describe en el presente texto, para aumentar o mejorar la unión con los objetivos y/o disminuir la unión con las impurezas. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede realizarse a una temperatura de alrededor de 23° C, 18° C, 16° C o menos.

### ***Cromatografía en modo mixto***

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de cromatografía en modo mixto.

La cromatografía en modo mixto es un tipo de cromatografía en el que se aplican diversos modos de separación para resolver una mezcla de diferentes moléculas, normalmente en cromatografía líquida. Por ejemplo, una separación en modo mixto puede incluir fases combinadas que muestran características de intercambios de iones y de fases inversas al mismo tiempo. Estas fases estacionarias con más de un tipo de interacción están disponibles de la mano de diversos fabricantes de columnas.

En algunas realizaciones, la cromatografía en modo mixto incluye una cromatografía de hidroxiapatita cerámica (HA). Normalmente, la hidroxiapatita (HAP) hace referencia a la forma cristalina del fosfato de calcio. El mecanismo de la HAP comprende interacciones no específicas entre grupos carboxilos de proteínas cargados negativamente e iones de calcio en la resina cargados positivamente, y grupos amino de proteínas cargados positivamente e iones de fosfato en la resina cargados negativamente. Las proteínas básicas o ácidas pueden adsorberse en la columna de forma selectiva ajustando el pH del tampón; la elución se puede conseguir variando la concentración de sal del tampón. De nuevo, resulta evidente que pueden emplearse numerosas composiciones de tampones y también numerosas combinaciones de tampones. Sin embargo, normalmente la columna puede equilibrarse con 1-10 lavados de la misma usando un tampón que tiene 0,001 M de NaPO<sub>4</sub>, 0,02 M de MES-Tris, 0,26 M de NaCl y un pH de 7.0. Según convenga, la muestra puede cargarse en el tampón del paso previo del proceso de purificación, o bien la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. La columna puede lavarse con 1-10 volúmenes de columna del tampón utilizado para equilibrar, seguidos de un tampón de lavado que contiene 0,005 M de NaPO<sub>4</sub>, 0,02 M de MES-Tris, 0,26 M de NaCl y un pH de 7.0. De forma alternativa, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualesquiera otros tampones de equilibrio, carga y lavado descritos en el presente texto y utilizados en cromatografías en modo mixto. La muestra puede eluirse en un tampón que contiene 0,04 M de NaPO<sub>4</sub> y un pH de 7.0. Opcionalmente, la columna puede decaparse mediante un lavado con 1-10 volúmenes de columna de 0,4 M de NaPO<sub>4</sub> y un pH de 12. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en el presente texto y utilizado en cromatografías en modo mixto.

En algunas realizaciones, la purificación de la ASA mediante una cromatografía en modo mixto sucede a la purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, una cromatografía de intercambio aniónico). Sin embargo, también se contempla que estos pasos puedan realizarse en orden inverso.

### ***Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)***

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de cromatografía de interacción hidrofóbica.

La cromatografía de interacción hidrofóbica utiliza la atracción de una determinada molécula hacia un entorno polar o no polar y, en referencia a las proteínas, esta propensión se rige por la hidrofobia o la hidrofilia de los residuos presentes en la superficie exterior expuesta de una proteína. Así, las proteínas se fraccionan según sus diversos grados de atracción hacia una matriz hidrófoba, normalmente un soporte interior con brazos alquilos enlazadores con una cadena que tiene una longitud de 2-18 carbonos. La fase estacionaria se compone de pequeños grupos no polares (butilo, octilo o fenilo) unidos al esqueleto o estructura central de un polímero hidrófilo (por ejemplo, SEPHAROSE™, dextrano o agarosa entrelazados). Así, normalmente la columna de HIC es una columna de butil SEPHAROSE™ o una columna de fenil SEPHAROSE™, más habitualmente una columna de fenil SEPHAROSE™.

El proceso de carga, lavado y elución en una HIC siguen básicamente los mismos principios que se han descrito previamente en relación con la cromatografía de intercambio iónico, pero, a menudo, se aplican unas condiciones prácticamente opuestas a las utilizadas en la cromatografía de intercambio iónico. Así, el proceso de la HIC requiere el uso de un tampón de carga con un nivel alto de sal, que desenlaza la proteína para dejar expuestos los sitios hidrófobos. La proteína es retenida mediante los ligandos hidrófobos de la columna, y queda expuesta a un gradiente de tampones que contienen concentraciones de sal decrecientes. A medida que la concentración de sal

disminuye, la proteína recupera su estructura original o nativa y, finalmente, se eluye de la columna. Alternativamente, las proteínas pueden eluirse con PEG.

5 El uso de fenil SEPHAROSE™ como fase sólida en la HIC es habitual en la presente divulgación. De nuevo, resulta evidente de inmediato que, cuando se trata de las condiciones exactas y de los tampones y combinaciones de tampones utilizados para los procesos de carga, lavado y elución, existe un gran número de posibilidades diferentes. En una realización habitual, la columna puede equilibrarse en un tampón que tiene 0,05 M de NaPO<sub>4</sub>, 1 M de NaCl y un pH de 5.5. Según convenga, la muestra puede cargarse en el tampón del paso previo del proceso de purificación, o bien la muestra puede cargarse usando un tampón de carga. El lavado puede realizarse usando 1-2 lavados de columna con un tampón de equilibrio, seguidos de 1-5 volúmenes de columna de 10 0,02 M de MES, 0,05 M de NaPO<sub>4</sub>, 0,5 M de NaCl y un pH de 5.5. De forma alternativa, la columna puede equilibrarse, cargarse y lavarse con cualesquiera otros tampones de equilibrio, carga y lavado descritos en el presente texto y utilizados en la HIC. La arilsulfatasa A puede eluirse usando 0,02 M de MES-Tris, 0,06 M de NaCl y un pH de 7.0. Alternativamente, la muestra puede eluirse en cualquier otro tampón de elución descrito en el presente 15 texto en relación con la HIC.

En algunas realizaciones, la purificación de la arilsulfatasa a mediante una HIC sucede a la purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, una cromatografía de intercambio aniónico). En métodos de la presente invención, la purificación de la arilsulfatasa A mediante una HIC sucede a la purificación mediante una cromatografía en modo mixto. 20

### **Ultrafiltración/Diafiltración**

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de ultrafiltración y/o diafiltración. 25

El término 'ultrafiltración' hace referencia a un proceso de separación de membrana, regido por un gradiente de presión, en el que la membrana fracciona los componentes de un líquido en función de su tamaño y estructura solvatados. La 'diafiltración' es un tipo especializado de proceso de ultrafiltración en el que la fracción retenida se diluye con agua y se re-ultrafiltra para reducir la concentración de los componentes solubles de filtrado y aumentar aún más la concentración de los componentes retenidos. 30

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A se purifica mediante su separación de los contaminantes según el tamaño de estos en un entorno ácido y utilizando una filtración de flujo tangencial. La arilsulfatasa A forma un octámero con un pH bajo con un peso molecular teórico de 480 kDa y, por consiguiente, será retenida por una membrana relativamente abierta, mientras que la mayor parte de los contaminantes pasarán esta membrana (Sommerlade et al., (1994) Biochem. J., 297; 123-130; Schmidt et al., (1995) Cell, 82, 271-278; Lukatela et al., (1998) Biochemistry, 37, 3654-3664). 35

En una realización habitual, el tampón de diafiltración contiene 0,01 M de fosfato-citrato de sodio, 0,137 M de NaCl y un pH de 6.0. 40

En algunas realizaciones, como el material reactivo o material de partida para este proceso es una suspensión de arilsulfatasa A tal y como se ha eluido de la columna de cromatografía en el paso previo del proceso, el pH de esta suspensión se ajusta a 4-5 mediante la adición de 0,2-1 M de Na-acetato con un pH de 4.5. Después, se realiza una diafiltración a 1-10 volúmenes de tampón de Na-acetato con un pH de 4.0-5.5 de un modo que resulta muy conocido para una persona versada en la materia. La filtración puede realizarse mediante la aplicación de diversos tipos de filtros diferentes con un peso nominal cuyos valores de corte son de entre 20 y 450 kDa; sin embargo, es habitual usar un filtro con un valor de corte de entre 100 y 300 kDa. Para un procesamiento adicional de la solución que contiene arilsulfatasa A, el pH se ajusta hasta un valor de entre 7 y 8 mediante la adición de una base de Tris para obtener una concentración final de aproximadamente 20-50 mM. 45 50

Como alternativa a la filtración de flujo tangencial ácida que se ha explicado previamente, la separación de la ASA respecto a los contaminantes puede lograrse mediante una filtración en gel ácida utilizando básicamente las mismas condiciones y composiciones de tampones. La filtración se realiza con un pH bajo y por medio de una columna de filtración en gel, que se ha equilibrado con una solución con un pH bajo, por ejemplo, una solución de Na-acetato de 0,2-0,9 M y un pH de 4-5. Opcionalmente, la solución de arilsulfatasa A puede concentrarse mediante filtración de flujo tangencial utilizando un filtro de 20-50 kDa antes de la filtración en gel. El grado de concentración puede variar considerablemente, de manera que la arilsulfatasa A puede estar concentrada desde alrededor de 0,1 mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml, preferiblemente alrededor de 5 mg/ml. 55 60

En algunas realizaciones, el conjunto de muestras se concentra con una pantalla Biomax A (30 kDa). La diafiltración se realiza con 3-5 lavados de columna de 20 mM de Na-acetato, pH de 5.4-5.7.

### **Filtración para eliminar virus**

Los métodos de purificación descritos en el presente texto pueden incluir uno o más pasos de filtración para 65

eliminar virus (o filtración para la eliminación de virus).

Normalmente, la filtración de virus se realiza tras la purificación de la enzima mediante uno o más pasos de cromatografía. En algunas realizaciones, el paso o proceso de filtración de virus se realiza mediante el pasaje de la solución que contiene la ASA, que es el resultado de un paso de purificación a través de un filtro esterilizado y el posterior pasaje de la solución filtrada esterilizada a través de un nanofiltro. Con el término 'filtro esterilizado' se hace referencia a un filtro que elimina básicamente todos los microorganismos capaces de propagar y/o causar infecciones. Mientras que el filtro habitual tiene un tamaño de poros de alrededor de 0,1 micras, el tamaño de los poros puede variar entre alrededor de 0,05 y 0,3 micras. Puede ser factible reemplazar o combinar la filtración de virus de la muestra, tal y como se ha realizado en el proceso de purificación, con el procedimiento de poner en contacto la muestra con un detergente.

### **Formulación**

Los métodos descritos en el presente texto pueden dar como resultado un producto o formulación (también llamada 'preparación') que contiene una cantidad relativa de arilsulfatasa A bioactiva, en particular, arilsulfatasa A, que supone al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, al menos un 99,5%, al menos un 99,6%, al menos un 99,7%, al menos un 99,8% o al menos un 99,9% de la cantidad total de proteínas presentes en el producto o formulación, tal y como se determina mediante HPLC de fase inversa o HPLC de exclusión de tamaño.

Puede prepararse una formulación (o preparación) terapéutica que comprenda el polipéptido, conjugado opcionalmente con una molécula heteróloga, mezclando el polipéptido que tenga el grado de pureza deseado con un portador, excipiente o estabilizador opcional farmacéuticamente aceptable ('Remington's Pharmaceutical Sciences', 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes y estabilizadores 'farmacéuticamente aceptables' no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro amónico de octadecidimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio: alcohol fenol, butil o bencilo; parabenos alquilo como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones que forman sales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteínas); y/o surfactantes no iónicos como polisorbato, poloxámeros o polietilenglicol (PEG).

Los ingredientes activos también pueden encontrarse dentro de microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de liberación de medicamentos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se desvelan en 'Remington's Pharmaceutical Sciences', 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

También pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrófobos que contienen la variante del polipéptido, de manera que dichas matrices están en forma de productos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o polivinilalcohol, poliactidos (Patente de EE UU N° 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

El polipéptido purificado tal y como se ha desvelado en el presente texto o la composición que contiene el polipéptido y un portador farmacéuticamente aceptable se utiliza posteriormente para diversos diagnósticos, terapias u otros usos conocidos para dichos polipéptidos y composiciones. Por ejemplo, el polipéptido puede usarse para tratar un desorden en un mamífero administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido.

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa se formula o prepara en una solución isotónica como una de 154 mM de NaCl, o 0,9% de NaCl y 10-50 mM de fosfato de sodio con un pH de 6,5-8,0 o fosfato de sodio, glicina, manitol o las correspondientes sales de potasio. En otra realización, la ASA se formula en un tampón fisiológico, como, por ejemplo:

a) un tampón de formulación I que contiene (en mM): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,50-3,90), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0-0,5), glicina (25-30), manitol (230-270) y agua para inyección; o

b) un tampón de formulación II que contiene (en mM): Tris-HCl (10), glicina (25-30), manitol (230-270) y agua para inyección.

La arilsulfatasa A purificada puede prepararse para administrarse directamente al sistema nervioso central (CNS), por ejemplo, por vía intratecal o intracerebral, o para administrarse por otros medios, por ejemplo, por vía intravenosa (IV), o ambas, ya sea de manera simultánea, de manera secuencial o de cualquier otra forma combinada, de acuerdo con un paradigma de tratamiento determinado por un médico para cada paciente. Por ejemplo, la composición farmacéutica descrita en el presente texto puede administrarse por una vía que incluye una administración intracerebroventricular, espinal, intratecal o intracraneal. La composición farmacéutica descrita en el presente texto también puede administrarse por una vía que no sea una administración intracerebroventricular, espinal, intratecal o intracraneal, como una vía seleccionada de un grupo que comprende la administración intravenosa, intraarterial, oral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraparenquimal, a través de la mucosa, nasal y rectal.

La arilsulfatasa A purificada mediante un método descrito en el presente texto puede usarse como medicamento para reducir los niveles de esfingolípidos 3-O-sulfogalactosilceramida (galactosil sulfátido) en las células del sistema nervioso periférico y/o del sistema nervioso central de un sujeto que padece de y/o al que le han diagnosticado leucodistrofia metacromática. La administración de ASA provocará una disminución en el deterioro de las habilidades de aprendizaje motor y/o un aumento en la velocidad de la conducción del sistema motor nervioso y/o en la amplitud de la conducción nerviosa.

La inyección intratecal (esto es, la inyección directa en el fluido cerebroespinal) de alfa-L-iduronidasa humana recombinante (rhIDU) puede reducir el almacenamiento de carbohidratos en el tejido cerebral en el caso de un tipo de mucopolisacaridosis canina (MPL) (Kakkis, 2003).

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente texto se administra directamente al sistema nervioso central (CNS) de un sujeto, logrando así una reducción de las células diana del CNS del sujeto.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente texto se administra por vía intravenosa y/o inyección espinal a un sujeto, logrando así una reducción en los niveles de galactosil sulfátido de las células diana del sistema nervioso periférico y en las células diana del sistema nervioso central del sujeto.

En algunas realizaciones, la arilsulfatasa A descrita en el presente texto se endocitosa eficazmente 'in vivo' en las células diana de un tejido seleccionado de un grupo que comprende el CNS (por ejemplo, oligodendroglía), el sistema nervioso periférico (por ejemplo, células de Schwann), el hígado, los riñones, el bazo y el corazón.

También se contempla que la naturaleza exacta de los planes de tratamiento basados en el método de acuerdo con la presente invención dependerán de factores como la edad, el sexo y el estadio de la enfermedad del sujeto que se va a tratar, y que el régimen óptimo de dosis y la frecuencia de administración pueden determinarse, de manera ventajosa, sobre una base empírica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse en una o más dosis, de manera que cada dosis contiene una cantidad de arilsulfatasa A de entre alrededor de 0,1 y alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre alrededor de 0,25 y alrededor de 50, entre alrededor de 1 y alrededor de 25, entre alrededor de 1 y alrededor de 10 o entre alrededor de 1 y alrededor de 5 mg/kg de peso corporal. La composición farmacéutica también puede administrarse siguiendo un régimen diario, semanal, bisemanal o mensual.

Debe entenderse que el término 'niveles efectivos o eficaces' hace referencia a los niveles de arilsulfatasa A que son efectivos o eficaces para provocar una reducción de al menos un 10% del esfingolípidos 3-O-sulfogalactosilceramida (galactosil sulfátido) almacenado en las células de los órganos viscerales, incluyendo los riñones, o en el CNS, tal y como se determina, por ejemplo, mediante una TLC (también llamada 'cromatografía en capa fina' o 'CCF') realizada 8 días después de la administración de arilsulfatasa A por vía intratecal o intravenosa, por ejemplo. Puede ser preferible que la reducción del galactosil sulfátido sea de al menos alrededor de un 15%, al menos alrededor de un 20%, al menos alrededor de un 25%, al menos alrededor de un 30% o al menos alrededor de un 40% con respecto a los niveles presentes antes de la administración de la enzima. Además, puede ser preferible que la arilsulfatasa A se administre en una cantidad de entre alrededor de 5 y 100 mg de enzima por kg de peso corporal, por ejemplo, alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, alrededor de 30 mg/kg de peso corporal, alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 60 mg/kg de peso corporal, alrededor de 70 mg/kg de peso corporal, alrededor de 80 mg/kg de peso corporal o alrededor de 90 mg/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente texto incluye complementos y/o formulaciones con una capacidad reconocida para facilitar la administración de macromoléculas a través de la barrera hematoencefálica.

En algunas realizaciones, el uso de complementos o adjuntos, como compuestos o formulaciones con una

capacidad reconocida para facilitar la administración de macromoléculas al sistema nervioso central, no parece ser necesario para obtener el efecto observado en el sistema nervioso central. Por ello, en algunas realizaciones, el medicamento no comprende ninguno de los siguientes componentes:

- 5 a) un vehículo, como un péptido o polipéptido, para administrar la enzima (arilsulfatasa A) al sistema nervioso central, y  
 b) un componente capaz de provocar la apertura o la disrupción de la barrera hematoencefálica, y  
 c) una célula intacta, incluyendo una célula transducida, como una célula autóloga transducida, por ejemplo, fibroblastos o linfocitos de la sangre periférica transducidos.

10 En algunas realizaciones, un tratamiento suplementario con cualquiera de los agentes o componentes mencionados previamente puede resultar innecesario. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el medicamento es para administrárselo a un sujeto que no está recibiendo ningún tratamiento adicional para reducir los niveles de esfingolípido 3-O-sulfogalactosilceramida, incluyendo:

- 15 a) la administración de una formulación que comprende un vehículo, como un péptido, polipéptido o anticuerpo, para administrar la enzima (arilsulfatasa A) al sistema nervioso central, y  
 b) la administración de un componente capaz de provocar la apertura o la disrupción de la barrera hematoencefálica, y  
 20 c) la administración de una célula intacta, incluyendo una célula transducida, como una célula autóloga transducida, por ejemplo, fibroblastos o linfocitos de la sangre periférica transducidos.  
 En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende además una solución hipertónica o se administra junto con una solución hipertónica para provocar la apertura osmótica de la barrera hematoencefálica.

25 La actividad enzimática, que debe entenderse como la actividad catalítica de la ASA, puede medirse con un ensayo enzimático basado en la hidrólisis -mediada por la ASA- de un sustrato detectable o de un sustrato que produce un producto final detectable. En un aspecto, el ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato -sintético y cromogénico- sulfato de para-Nitrocatecol (pNCS), cuyo producto final, el para-Nitrocatecol, absorbe luz a 515 nm.

30 Por ejemplo, un ensayo enzimático de arilsulfatasa A puede ser el siguiente:

35 **Materiales:** 50 mM de sulfato de p-Nitrocatecol: disolver 0,156 g de sulfato de p-Nitrocatecol (Sigma, Catálogo # N-7251) en 10 ml de H<sub>2</sub>O doblemente destilada (dd). Guardar en papel de aluminio a 4° C.

3 M de acetato de sodio, pH de 5.0: disolver 24,69 g de acetato de sodio en 100 ml de H<sub>2</sub>O dd, ajustada a un pH de 5 y guardar a temperatura ambiente.

40 **Tampón de ensayo 4X** (debería prepararse el mismo día de uso): mezclar 5,0 ml de 3 M de acetato de sodio, pH de 5.0, 6,0 ml de 50 mM de sulfato de p-Nitrocatecol y 4,0 ml de H<sub>2</sub>O dd.

1 M de NaOH: 4 g de NaOH + 100 ml de H<sub>2</sub>O dd; guardado a temperatura ambiente.

45 **Procedimiento:** por motivos de detección y análisis, los ensayos se realizaron en placas Elisa con fondo plano. Se añadieron 25 µL del tampón de ensayo 4X a 75 µL de muestra o una dilución adecuada de esta. Las placas se incubaron durante la noche a 4° C, se detuvo el proceso con 200 µL de 1M de NaOH y se registró la absorbancia a 515 nm en un lector de placa.

50 Para determinar la actividad específica de las muestras purificadas con DEAE, los ensayos se dispusieron en tubos y se doblaron todos los volúmenes. Las incubaciones se realizaron a 37° C durante periodos de entre 5 y 20 minutos usando 10-1000 ng de enzima. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro utilizando una cubeta con un recorrido de 1 cm. La actividad específica se define como los moles de sulfato de p-Nitrocatecol hidrolizados por minuto por cada mg de proteína a 37° C, pH de 5.0.

55 **Cálculos:** una Unidad (1 U) de actividad enzimática se define como la hidrólisis de 1 µmol de sulfatasa de p-Nitrocatecol (pNCS) por minuto a 37° C, pH de 5.0.

Se utiliza la siguiente ecuación para calcular la actividad enzimática en µmoles de pNCS hidrolizada / min x ml (=Unidades/ml):

60 
$$\frac{V_{tot} (ml)}{\epsilon M / 1000 \times V_{muestra} (ml) \times \text{Tiempo de incubación (min)}} \times \Delta A = \text{Unidades/ml (1)}$$

65 donde:

$\Delta A$  = absorbancia de la muestra – absorbancia del blanco

V<sub>tot</sub> (ml) = volumen total de reacción en ml (en este caso, 0,15 ml)  
 V<sub>muestra</sub> (ml) = volumen de muestra añadido, en ml (en este caso, 0,05 ml)  
 εM = el coeficiente de extinción molar del producto pNC, que, en este caso, es 12 400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

5 La ecuación 1 puede simplificarse más si se escribe como:

$$\frac{\Delta A \times (0,15 / (12\,400/1000 \times 0,05 \times 30))}{X \mu\text{mol(es)} / (\text{minuto(s)} \times \text{ml})} = \text{Unidades/ml} \quad (1)$$

10 Para calcular la actividad específica en μmoles del pNC consumido/(minuto(s) x mg) (=Unidades/mg), dividir la ecuación 1 por la concentración de proteínas de la muestra:

$$\text{Ecuación 1} / \text{Concentración de proteínas (mg/ml)} = Y \mu\text{moles} / (\text{minuto(s)} \times \text{mg}) = \text{Unidades/mg} \quad (2)$$

15 La concentración total de proteínas en las muestras en proceso y los productos finales puede determinarse mediante un ensayo disponible comercialmente que utiliza los principios de la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> por medio de proteínas en un medio alcalino (la reacción de Biuret). Una persona versada en la materia conoce bien este método.

20 La concentración de arilsulfatasa A en las muestras recogidas después de varios pasos del proceso de purificación puede calcularse por medio de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (también denominado 'ELISA', por sus siglas en inglés) con arilsulfatasa A. La determinación cuantitativa de una proteína mediante ELISA es una técnica convencional bien conocida por las personas con conocimientos y habilidades ordinarios en este campo. Sin embargo, está dentro del alcance de la presente invención proporcionar una ELISA específica para la detección de rASA que se basa en capturar o atrapar la enzima con inmunoglobulinas policlonales específicas y, posteriormente, detectar la enzima capturada con anticuerpos monoclonales específicos.

30 La pureza y la identidad de las diferentes preparaciones de arilsulfatasa A pueden determinarse mediante métodos que las personas con habilidades ordinarias en esta materia conocen bien, como HPLC de fase inversa, SDS-PAGE y 'Western blot' de arilsulfatasa A. Además, la cantidad de proteínas de células enteras ('HCP', por sus siglas en inglés) en las preparaciones de arilsulfatasa A puede determinarse usando ELISA y también técnicas de 'Western blot' que utilizan anticuerpos disponibles comercialmente. Normalmente, todos los procesos mencionados previamente se adaptan por comodidad para llevarlos a cabo en placas microtituladoras.

35 Una de las características del producto de arilsulfatasa A y de la formulación que contiene arilsulfatasa A de acuerdo con la presente divulgación es su muy bajo contenido de proteínas de células huésped. En un producto o formulación previstos para ser una composición farmacéutica o un producto pensados para usarse en la preparación de una composición farmacéutica, el contenido de las mencionadas proteínas es fundamental, puesto que se espera que tengan efectos inmunogénicos. En una realización habitual de la invención, el producto o formulación finales contienen menos de un 1,5% de proteínas de células enteras, como menos de un 1%, por ejemplo, menos de un 0,75% o menos de un 0,5% o menos de un 0,25% de proteínas de células enteras. Además, el producto o formulación pueden contener impurezas en forma de variantes del componente principal enzimáticamente inactivas. En una realización habitual, el producto o formulación de acuerdo con la presente invención contiene al menos un 90% de ASA enzimáticamente activa, como un 92% o un 94%. En una realización aún más habitual, la cantidad relativa de arilsulfatasa A enzimáticamente activa es de al menos un 95%, como un 96% o un 97% o incluso un 98% o un 99%, tal y como se determina mediante HPLC de fase inversa o HPLC de exclusión de tamaño.

50 Una característica adicional de la enzima o formulación preparada de acuerdo con el proceso de la invención es su elevado nivel de actividad específica. Por ello, es preferible que la formulación o la composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación contengan arilsulfatasa A con una actividad específica de al menos 10 U/mg, al menos 20 U/mg, al menos 25 U/mg, al menos 30 U/mg, al menos 40 U/mg, al menos 50 U/mg, al menos 60 U/mg, al menos 70 U/mg, al menos 75 U/mg, al menos 80 U/mg, al menos 85 U/mg, al menos 90 U/mg, al menos 100 U/mg, al menos 150 U/mg, al menos 200 U/mg, al menos 250 U/mg o al menos 300 U/mg de proteína, por ejemplo, tal y como se determina mediante un método descrito en el presente texto. Habitualmente, la ASA tiene una actividad específica de entre alrededor de 50 U/mg y alrededor de 140 U/mg.

55

**Reivindicaciones**

1. Un método para purificar la arilsulfatasa A (ASA) de una muestra; el método incluye:  
 5 proporcionar una muestra de ASA,  
 someter la muestra a una primera cromatografía de intercambio iónico que es una cromatografía de intercambio aniónico,  
 someter la muestra a una cromatografía en modo mixto,  
 someter la muestra a una cromatografía de interacción hidrofóbica, y  
 someter la muestra a una segunda cromatografía de intercambio iónico,  
 10 de manera que la muestra se somete a la cromatografía en modo mixto antes que a la cromatografía de interacción hidrofóbica.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la ASA purificada tiene una actividad específica de entre  
 15 alrededor de 50 U/mg y alrededor de 140 U/mg.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la ASA purificada contiene menos de un 1,5% de proteínas de células enteras.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de proteína ASA procede  
 20 de un extracto celular crudo o un sobrenadante de un cultivo celular.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que el método comprende someter la muestra de ASA a una primera cromatografía de intercambio iónico que es una cromatografía de intercambio aniónico, someter la muestra de la primera cromatografía de intercambio iónico a una cromatografía en modo mixto, someter la muestra de la cromatografía en modo mixto a una cromatografía de interacción hidrofóbica, y someter la muestra de la cromatografía de interacción hidrofóbica a una segunda cromatografía de intercambio iónico, obteniendo así una proteína ASA purificada.  
 25
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de intercambio aniónico es una cromatografía de intercambio aniónico de aminas cuaternarias.  
 30
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda cromatografía de intercambio iónico es una cromatografía de intercambio catiónico y en el que, opcionalmente, la cromatografía de intercambio catiónico es una cromatografía de intercambio catiónico con sulfopropilo (SP).  
 35
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía en modo mixto es una cromatografía de hidroxiapatita cerámica (HA).
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía de interacción hidrofóbica es una cromatografía de fenilo, una cromatografía de butilo o una cromatografía de octilo.  
 40
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende, además, someter la muestra de ASA a una inactivación viral y en el que, opcionalmente, la inactivación viral comprende la adición de un disolvente o un detergente.  
 45
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende, además, someter la muestra de ASA a una filtración para eliminar virus y en el que, opcionalmente, la filtración para eliminar virus incluye pasar la solución que contiene la ASA a través de un filtro esterilizado y, posteriormente, pasarla a través de un nanofiltro.  
 50
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende, además, un paso de filtración en profundidad.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína ASA purificada de acuerdo con el método se prepara o formula en una composición farmacéutica.  
 55
14. El método de la reivindicación 13, en el que la composición se prepara o fórmula para su administración intravenosa o intratecal.
15. El método de la reivindicación 13 o 14, en el que la composición se prepara o formula para usarse en un método para tratar la leucodistrofia metacromática (MLD) de un sujeto.  
 60