

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 185**

51 Int. Cl.:

C08F 4/52	(2006.01)
C07K 14/65	(2006.01)
A61K 38/47	(2006.01)
C12N 9/24	(2006.01)
C12N 9/96	(2006.01)
C12N 9/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012 PCT/US2012/039705**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166653**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12793015 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2714752**

54 Título: **Métodos para acoplar péptidos direccionadores a enzimas lisosomales recombinantes para optimizar los tratamientos de las enfermedades por depósito lisosomal**

30 Prioridad:

27.05.2011 US 201161490957 P

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

21.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DO, HUNG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 660 185 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 acoplar péptidos direccionadores a enzimas lisosomales recombinantes para optimizar los tratamientos de las enfermedades por depósito lisosomal.

Campo técnico

- 5 El campo técnico se refiere a la química de los polipéptidos. El campo técnico también se refiere a un método para preparar un péptido direccionador conjugado con una enzima lisosomal recombinante, al conjugado obtenido mediante este método y a su uso en el tratamiento de las enfermedades por depósito lisosomal.

Antecedentes

- 10 Los lisosomas son organelos intracelulares especializados, en los que las proteínas, diversos lípidos (incluso los glucolípidos y el colesterol) y los carbohidratos se degradan y reciclan a sus constituyentes primarios que permiten la síntesis de proteínas, componentes de la membrana y otras moléculas nuevos. Los lisosomas también son utilizados por las células para ayudar a mantener la homeostasis y la salud celular mediante un proceso celular adaptativo, conocido como autofagia, que incrementa la actividad lisosomal para proveer aminoácidos adicionales, con lo cual aumenta la biosíntesis de las diversas proteínas (por ejemplo, anticuerpos e interferones) y para aportar nutrientes destinados a la producción de energía, a fin de poder enfrentar los períodos de estrés de privación de nutrientes o infecciones virales. Cada proceso metabólico es catalizado por una enzima lisosomal residente específica. Las mutaciones genéticas pueden causar deficiencias en las actividades biológicas lisosomales que alteran los procesos metabólicos y conllevan a enfermedades clínicas. Los trastornos por depósito lisosomal (LSD, *lysosomal storage disorders*) son una clase de aproximadamente 50 enfermedades metabólicas humanas diferentes, causadas por una deficiencia de proteínas lisosomales específicas, lo cual deviene en la acumulación de diversas sustancias dentro de los compartimientos endosomales/lisosomales. Muchas de estas enfermedades se han caracterizado bien para comprender la deficiencia de las proteínas lisosomales y el defecto metabólico resultante. Por ejemplo, hay varios LSD de catabolismo alterado de los glucolípidos, tales como las enfermedades de Gaucher, Fabry, y Tay-Sachs/Sandhoff. La enfermedad de Niemann-Pick C se caracteriza por el deterioro en el metabolismo de los lípidos y el colesterol, en tanto que las enfermedades relacionadas con las alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos —tales como las enfermedades por depósito de glucógeno del tipo II (Pompe) y del tipo III (Corey-Forbes)— también han sido caracterizadas. Otros LSD alteran el metabolismo de las matrices óseas y extracelulares [por ejemplo, las mucopolisacaridosas (MPS I-VII), enfermedad de Gaucher] y el recambio proteico (lipofuscinosis ceroides neuronales; Batten, etc.). Si bien los LSD son relativamente raros, pueden causar enfermedades crónicas graves y a menudo la muerte, si no se los trata efectivamente.

- 35 No hay curas conocidas para las enfermedades por depósito lisosomal, aunque se han investigado varios abordajes terapéuticos diferentes para diversos LSD, incluso el trasplante de médula y de cordón umbilical, la terapia de reemplazo enzimático (ERT, *enzyme replacement therapy*), la terapia de reducción de sustrato (SRT, *substrate reduction therapy*) y la terapia de chaperonas farmacológicas. También se está desarrollando la terapia génica, aunque no se la ha probado clínicamente. De estos abordajes terapéuticos, la ERT es la más establecida, dado que hay múltiples ERT aprobadas para el tratamiento de varios LSD, que incluyen las enfermedades de Gaucher, Fabry, Pompe, MPS I, MPS II y MPS VI, mientras que un fármaco de SRT se ha aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

- 40 El concepto de ERT para el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal es bastante simple; consiste en administrar una enzima lisosomal recombinante humana a los pacientes, para complementar las deficiencias en la actividad biológica y mejorar los síntomas clínicos. Sin embargo, a diferencia de otros tratamientos terapéuticos con proteínas que funcionan básicamente en la superficie de las células o fuera de las células (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF y otros, eritropoyetina, factores coagulantes, etc.), las enzimas lisosomales deben funcionar dentro de las células, dentro de los lisosomas y por ende, requieren de un mecanismo para entrar a las células desde afuera y el posterior suministro a estos compartimientos internos. En los mamíferos, las estructuras ramificadas de los carbohidratos sobre la estructura central de la proteína en ciertos residuos de asparagina (oligosacáridos N-enlazados; N-glicanos) para la mayoría de las enzimas lisosomales solubles se modifican post-traducción para formar una estructura de carbohidratos especializada, llamada manosa 6-fosfato (M6P, *Mannose-6-phosphate*). La M6P es la señal biológica natural para la identificación y el transporte de las proteínas lisosomales recientemente sintetizadas a partir del aparato de Golgi a los lisosomas, mediante receptores de la M6P ligados a la membrana. Una clase de receptores de la M6P (el receptor de la M6P independiente de los cationes; CI-MPR, *cation-independent M6P receptor*) también se cicliza hacia la membrana plasmática y es funcionalmente activo para unir e internalizar las proteínas lisosomales exógenas. Se cree que el CI-MPR ha evolucionado para recapturar las proteínas lisosomales que se escaparon de las células (mediante la secreción fuera de las células) y de este modo, provee un mecanismo direccionador para internalizar las proteínas lisosomales exógenas y constituye la base para la terapia de reemplazo enzimático para diversos LSD.

Las terapias de reemplazo de enzimas lisosomales recombinantes han demostrado ser generalmente seguras, aunque su efectividad para reducir los síntomas clínicos varía en gran medida. Por ejemplo: la ERT con Fabrazyme™ (α -galactosidasa A ácida recombinante; Genzyme Corp.) administrada a una dosis de 1 mg/kg de peso

corporal, semana por medio, es suficiente para despejar el sustrato acumulado de las células endoteliales en la enfermedad de Fabry, en tanto que 40 mg/kg de Myozyme™ (α -galactosidasa A ácida recombinante humana, rhGAA; Genzyme Corp.) en una dosis administrada semana por medio solo es moderadamente efectiva para la enfermedad de Pompe. Esta eficacia dispar se atribuye básicamente a las diferencias en el contenido de M6P, de modo que los bajos niveles de M6P se correlacionan con un mal direccionamiento del fármaco y una menor eficacia. La fabricación de enzimas lisosomales recombinantes es muy desafiante porque es extremadamente difícil controlar el procesamiento de los carbohidratos —en particular, el nivel de M6P— en los sistemas de expresión de los mamíferos. Dos enzimas de Golgi especializadas catalizan la modificación de M6P; la *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa suma la *N*-acetilglucosamina unida a fosfato a ciertos residuos de manosa terminales, en tanto que la *N*-acetilglucosamina-1-fosfodiéster α -*N*-acetilglucosaminidasa (también conocida como enzima descubridora, *Uncovering Enzyme*) retira la *N*-acetilglucosamina de cobertura para descubrir la señal de M6P. Sin embargo, la *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa es limitante en las células y su reacción bioquímica es inherentemente ineficiente para diversas proteínas lisosomales. La sobreexpresión de proteínas lisosomales durante el proceso de fabricación exacerba en gran medida este problema y conduce a cantidades altamente variables de M6P. En consecuencia, el procesamiento de carbohidratos típicamente está incompleto y conduce a la producción de enzimas lisosomales recombinantes con mezclas de N-glicanos que contienen M6P, estructuras que no son de M6P del tipo N-glicanos con alto contenido de manosa y N-glicanos del tipo complejo (típicos para proteínas secretoras). Para complicar las cosas, las células muertas o dañadas liberan enzimas tales como fosfatasa hacia el medio de cultivo celular que elimina la M6P. En consecuencia, el menor contenido de M6P reduce la afinidad de unión de una enzima lisosomal recombinante para los receptores de la M6P y reduce su captación celular y por ende, reduce la eficacia del fármaco. Las células muertas o dañadas liberan otras glicosidasas que eliminan otros carbohidratos (por ejemplo, ácidos siálicos, galactosa, etc.) para revelar los carbohidratos internos que no se exponen típicamente y estos N-glicanos se identifican fácilmente como aberrantes. Estas estructuras incompletas de N-glicano aumentan la tasa de depuración de las proteínas lisosomales recombinantes de la circulación, lo que también puede reducir la eficacia del fármaco. Por lo tanto, hacen falta mayores dosis del fármaco para compensar la menor eficacia. Sin embargo, estos requisitos de aumento de dosis tienen múltiples implicancias negativas: (1) una dosis más alta del fármaco podría ser prohibitiva desde la perspectiva de los costes, puesto que engrosa aún más un tratamiento que de por sí ya es caro; (2) las altas dosis de los fármacos requieren largos tiempos de infusión; (3) las grandes cantidades de fármaco circulante dan como resultado significativas respuestas de los anticuerpos (que se observan en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Pompe) y muchos pacientes también han sufrido reacciones alérgicas durante las infusiones. La FDA [*Food and Drug Administration*, Administración Nacional de los Fármacos] ha emitido una “advertencia de etiqueta negra” para Myozyme, y el fármaco normalmente se administra muy lentamente al principio, aunque va en aumento durante el curso de la infusión. Esta estrategia ayuda a mitigar las respuestas alérgicas, aunque alarga sensiblemente los tiempos de infusión, donde las infusiones de 12 horas de duración no son raras.

Una estrategia potencial para mejorar el direccionamiento del fármaco para varias ERT lisosomales emplea un péptido direccionador para dirigir eficientemente las ERT hacia los lisosomas, sin requerir las estructuras de carbohidratos de M6P tradicionales. Esto es conceptualmente factible, ya que el receptor de M6P independiente de cationes contiene un dominio de unión distinto para un péptido pequeño llamado factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2, *insulin-like growth factor 2*) y este receptor se conoce como IGF-2/(IGF-2/CI -MPR). Este receptor es, de hecho, el único responsable de la internalización de proteínas lisosomales portadoras de M6P exógenas porque el IGF-2/CI-MPR está presente y biológicamente activo en la superficie celular. La otra clase de receptores M6P, el receptor M6P dependiente de cationes (CD-MPR, *cation-dependent M6P receptor*), solo participa en el transporte de proteínas lisosomales dentro de las células porque no es biológicamente activo en las superficies celulares y carece del dominio de unión del péptido IGF-2. El IGF-2/CI-MPR tiene dos sitios de unión separados para M6P (dominios 1-3 y 7-9, respectivamente), de forma que se une a un mono-M6P N-glicano (1 residuo M6P en N-glicano) con afinidad moderada o un bis-M6P-N-glicano (dos residuos de M6P en el mismo N-glicano) con una afinidad aproximadamente 3000 veces mayor. Dado que las proteínas lisosomales contienen mezclas de N-glicanos complejos (no M6P), mono y bis-M6P, sus afinidades por IGF-2/CI-MPR varían ampliamente dependiendo del tipo y la cantidad de N-glicanos portadores de M6P. El péptido IGF-2 tiene la mayor afinidad por el IGF-2/CI-MPR que es aproximadamente 230.000 veces mayor que el mono-M6P N-glicano. A continuación se presenta un resumen de las afinidades de unión de varios ligandos para el IGF-2/CI-MPR en la tabla 1

Tabla1. Afinidad del ligando por el IGF-2/CI-MPR

Ligando	Afinidad de unión (Kd aparente; nM)
M6P ^a	7000
pentamano-M6P ^a	6000
bis-M6P N-Glicano ^a	2
beta-galactosidasa ^a	20
WT hIGF-2 ^{b,c}	0,03-0,2
[Leu27] hIGF-2 ^c	0,05
[Leu43] hIGF-2 ^c	0,06

En los mamíferos, el IGF-2 es la hormona de crecimiento primaria durante el desarrollo embrionario. Después del nacimiento, los niveles de IGF-2 permanecen relativamente constantes, a pesar de que ya no intervienen en el crecimiento (crecimiento mediado por IGF-1, mediante la estimulación de la hormona de crecimiento humana durante toda la vida). El papel del IGF-2 después del nacimiento no se comprende bien, pero se cree que este péptido ayuda a la cicatrización de las heridas y en la reparación de los tejidos. El IGF-2 se une principalmente en la circulación mediante proteínas de unión de IGF séricas (IGFBP [*IGF binding proteins*] 1-6) que median los niveles de péptido IGF-2 libre. Estas IGFBP también se unen a la insulina y al IGF-1 y regulan sus niveles circulantes. El IGF-2/CI-MPR es la vía de eliminación natural para el péptido IGF-2 libre. Debido a que el IGF-2 es estructuralmente similar a la insulina y al IGF-1, tiene baja afinidad por el receptor de insulina (~100 veces menor) y el receptor de IGF-1 (~230 veces menor), en comparación con el IGF-2/CI-MPR. Esta especificidad puede mejorarse considerablemente mediante la eliminación de varios aminoácidos o la sustitución de residuos de aminoácidos específicos (por ejemplo, [Leu27] IGF-2 y [Leu43] IGF-2), para mantener la unión de alta afinidad al IGF-2/CI-MPR (Tabla 1), pero disminuye o elimina significativamente la unión a la insulina y los receptores de IGF-1. De forma similar, se ha demostrado que las variantes de IGF2 que carecen de los seis residuos de aminoácidos iniciales o una sustitución de arginina por ácido glutámico en la posición 6 reducen significativamente la afinidad del péptido de IGF2 por las IGFBP. Es importante destacar que el péptido IGF-2 ha demostrado ser seguro en ensayos clínicos y se utiliza clínicamente para ayudar a tratar ciertas deficiencias de crecimiento. Estos datos colectivos sugieren que el péptido IGF-2 podría utilizarse potencialmente como un motivo de focalización en lugar de las estructuras de carbohidrato M6P tradicionales para facilitar la captación celular y el transporte de enzimas lisosómicas recombinantes a los lisosomas.

Todavía existe la necesidad de desarrollar estrategias para crear proteínas ligadas al IGF-2- para mejorar el direccionamiento de las proteínas, al tiempo que se subsanan los problemas de procesamiento de los carbohidratos.

Sumario

En la presente, se provee un método para preparar un péptido direccionador conjugado con una enzima lisosomal recombinante, que comprende: (a)(i) modificar el término amino (N) y uno o más residuos de lisina en una enzima lisosomal recombinante humana, usando un primer agente entrecruzador para generar una enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador; (ii) modificar el primer aminoácido de un enlazador corto en el término amino (N) en un péptido de la variante IGF-2 usando un segundo agente entrecruzador, para generar un péptido de la variante IGF-2 modificado por un segundo agente entrecruzador, y (iii) conjugar la enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador con el péptido de la variante IGF-2 modificado por un segundo agente entrecruzador que contiene un enlazador corto; o

(b) conjugar un agente entrecruzador heterobifuncional con un péptido de la variante IGF-2 y luego conjugar el péptido de la variante IGF-2 modificado por un agente entrecruzador heterobifuncional con una enzima lisosomal recombinante humana, por reacción con el término N y uno o más residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana o

(c) conjugar un agente entrecruzador heterobifuncional con una enzima lisosomal recombinante humana por reacción con el término N y uno o más residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana; y conjugar la enzima lisosomal recombinante humana modificada por el agente entrecruzador heterobifuncional con un péptido de la variante IGF-2, donde la enzima lisosomal recombinante humana se selecciona entre α -glucosidasa recombinante humana (rhGAA), α -galactosidasa A (GLA) recombinante humana, β -glucuronidasa ácida (GUS) recombinante humana, α -iduronidasa A (IdUA) recombinante humana, isuronidato 2-sulfatasa (I2S) recombinante humana, β -hexosaminidasa A (HexA) recombinante humana, β -hexosaminidasa B (HexB) recombinante humana, α -manosidasa A recombinante humana, β -glucocerebrosidasa (GlcCer) recombinante humana, lipasa ácida recombinante humana (LPA) o cualquiera de sus combinaciones y

5 donde el primer agente entrecruzador se selecciona entre: N- succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), sulfo-succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (sulfo-S-HyNic), C6-succinimidil-6-hidrazino-nicotinamida (C6-S-Hynic), clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH), clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH) o N-hidroxisuccinimida-éster-(PEG)_n-hidrazida, donde n representa de 3-24 unidades de PEG; y el segundo agente entrecruzador se selecciona entre PEG4-pentafluorobencen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), succinimidil-4-formilbenzoato (SFB) y C6-succinimidil-4-formilbenzoato (C6-SFB); o

10 el primer agente entrecruzador se selecciona entre N-hidroxisuccinimida éster fosfina (NHS-fosfina), sulfo-N-hidroxisuccinimida éster-fosfina (sulfo-NHS-fosfina), N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno) o N-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n acetileno, donde n es 3-24 unidades de PEG, entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno o entrecruzadores heterobifuncionales que contienen ciclooctinas, tales como difluorociclooctina (DIFO) y dibenzociclooctina (DIBO); y el segundo agente entrecruzador se selecciona entre N-hidroxisuccinimida éster-PEG4-azida (HS-PEG4-azida), N-hidroxisuccinimida éster azida (NHS-azida), N-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n azida, donde n representa 3-24 unidades PEG, o NHS-PEG3-S-S-azida o

15 el agente entrecruzador heterobifuncional se selecciona entre m-maleimidobencil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), sulfo-*m*-maleimidobencil-N-hidroxisuccinimida éster (sulfo-MBS) y sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC) y

donde el péptido de la variante IGF-2 comprende una o más de las siguientes modificaciones con respecto a la secuencia de IGF-2 humana nativa:

20 sustitución de arginina para el ácido glutámico en la posición 6;

eliminación de aminoácidos 1-4 y 6;

eliminación de aminoácidos 1-4, 6 y 7;

eliminación de aminoácidos 1-4 y 6 y sustitución de lisina para treonina en la posición 7;

25 eliminación de aminoácidos 1-4 y sustitución de glicina para el ácido glutámico en la posición 6 y sustitución de lisina por treonina en la posición 7;

sustitución de leucina por tirosina en la posición 27;

sustitución de leucina por valina en la posición 43;

sustitución de arginina por lisina en la posición 65;

30 y/o el péptido de la variante IGF-2 comprende una etiqueta de afinidad y/o una región de extensión enlazadora de al menos 5 aminoácidos que preceden al IGF-2.

En la presente, también se proveen conjugados que comprenden uno o más péptidos de la variante IGF-2 químicamente conjugados con una enzima lisosomal recombinante humana.

También se proveen conjugados que comprenden un péptido de la variante IGF-2 modificado por un agente entrecruzador heterobifuncional conjugado con una enzima lisosomal recombinante humana.

35 En la presente, se provee además un conjugado conforme se define en este documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal, seleccionada entre las enfermedades de Pompe, Fabry, Gaucher, MPS I, MPS II, MPS VII, Tay Sachs, Sandhoff, α -manosidosis o Wohlman.

El péptido de la variante IGF-2 puede comprender la ID. DE SEC. N.º 2.

40 Las secuencias de aminoácidos que representan un enlazador de extensión pueden comprender la ID. DE SEC. N.º 3.

Breve descripción de los dibujos

45 Los aspectos que anteceden y otros de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, al considerarla en conjunto con los dibujos adjuntos. A los efectos de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones que se prefieren actualmente, entendiéndose, no obstante ello, que la invención no se limita a las instrumentalidades específicas reveladas. Los dibujos no necesariamente están a escala. En ellos:

50 La figura 1 (A) muestra una representación esquemática para la conjugación de una enzima lisosomal modificada con hidrazida con un péptido de la variante IGF2 modificado con benzaldehído. Antes de esta reacción de conjugación, las enzimas lisosomales se modifican químicamente con un primer agente entrecruzador, tal como N-succinimidil-6-hidrazinonicotinamida acetona (S-Hynic), que modifica el término amino y uno o más residuos de lisina

- en las enzimas lisosomales, para introducir grupos funcionales de hidrazida químicamente activos. En una reacción separada, el residuo de aminoácido con terminal N dentro de una región enlazadora de corta extensión en un péptido de la variante IGF2 se modifica químicamente con un segundo agente entrecruzador, tal como PEG4-pentafluorobencin-benzoato (PEG4-PFB), para introducir un grupo con función benzaldehído según se describe en la solicitud de patente. Después de la purificación de enzimas lisosomales modificadas con hidrazida y del péptido de la variante IGF2 modificado con benzaldehídos, estas proteínas se incuban juntas en un tampón ácido que contiene anilina, para formar enzimas lisosomales conjugadas con el péptido IGF-2. En esta reacción de conjugación, los grupos químicos de hidrazida químicamente activos reaccionan con grupos aldehído para formar uniones covalentes (de hidrazona) estables. La figura 1 (B) muestra otros primeros agentes entrecruzadores adecuados (succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH), clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH), y *N*-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n-hidrazida; en los cuales n = 3-24 unidades de PEG) y otros segundos agentes entrecruzadores (PEG4-pentafluorobencin-benzoato (PEG4-PFB), succinimidil-4-formilbenzoato (SFB), y C6- succinimidil-4-formilbenzoato (C6-SFB)) que se pueden utilizar.
- La figura 2 (A) muestra una representación esquemática para la conjugación de una enzima lisosomal modificada con fosfina con péptido de la variante IGF2 modificado con azida, mediante la reacción de ligazón de Staudinger. Antes de esta reacción de conjugación, las enzimas lisosomales se modifican químicamente con un primer agente entrecruzador, tal como sulfo- NHS-fosfina, que modifica el término amino y uno o más residuos de lisina en las enzimas lisosomales, para introducir grupos fosfina funcionales químicamente activos. En una reacción separada, el residuo de aminoácido con terminal N dentro de una región enlazadora de corta extensión en péptido de la variante IGF2 se modifica químicamente con un segundo agente entrecruzador, tal como NHS-(PEG)_n-azida, para introducir un grupo funcional azida. Después de la purificación de enzimas lisosomales modificadas con fosfina y del péptido de la variante IGF2 modificado con azida, estas proteínas se incuban juntas en un tampón levemente ácido para formar enzimas lisosomales conjugadas con el péptido IGF2. En esta reacción de conjugación, los grupos químicos azida químicamente activos reaccionan con los grupos fosfina, para formar uniones covalentes (de amida) estables. La figura 2 (B) muestra otros primeros agentes entrecruzadores adecuados (*N*-hidroxisuccinimida éster-fosfina (NHS-fosfina) y sulfo- *N*-hidroxisuccinimida éster-fosfina (Sulfo-NHS-fosfina) y segundos agentes entrecruzadores (*N*-hidroxisuccinimida éster-azida (NHS-azida), *N*-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n-azida; en los que n = 3-24 unidades de PEG, y NHS-PEG3-S-S-azida) que se pueden usar.
- La figura 3 (A) muestra una representación esquemática para la conjugación de enzima lisosomal modificada con acetileno con péptido IGF2 modificado con azida mediante la química de Click. Antes de esta reacción de conjugación, las enzimas lisosomales se modifican químicamente con un primer agente entrecruzador, tal como NHS-(PEG)_n-acetileno, que modifica el término amino y uno o más residuos de lisina en las enzimas lisosomales, para introducir grupos funcionales acetileno químicamente activos. En una reacción separada, el residuo de aminoácido con terminal N dentro de una región enlazadora de corta extensión en el péptido de la variante IGF2 se modifica químicamente con un segundo agente entrecruzador, tal como NHS-(PEG)_n-azida, para introducir un grupo funcional azida. Después de la purificación de enzimas lisosomales modificadas con acetileno y del péptido IGF2 modificado con azida, estas proteínas se incuban juntas en un tampón levemente ácido con iones de cobre (I), para formar enzimas lisosomales conjugadas con el péptido IGF2. En esta reacción de conjugación, los grupos químicos de azida químicamente activos reaccionan con grupos alquino para formar uniones covalentes (de triazol) estables. La figura 3 (B) muestra otros primeros agentes entrecruzadores adecuados (*N*-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno), *N*-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n-acetileno; donde n = 3-24 unidades de PEG, y NHS-PEG3-S-S-acetileno) y segundos agentes entrecruzadores (*N*-hidroxisuccinimida éster-azida (NHS-azida), *N*-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n-azida; donde n = 3-24 unidades de PEG, y NHS-PEG3-S-S-azida) que se pueden usar.
- La figura 4 (A) muestra una representación esquemática de la conjugación de enzimas lisosomales y del péptido IGF2, usando un solo agente entrecruzador, tal como *m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (MBS). En la primera reacción, los grupos maleimida químicamente reactivos reaccionan con el grupo sulfhidrilo libre de un residuo de cisteína con terminal C en una variante IGF2 del péptido. El péptido IGF2 modificado con MBS luego se purifica y se conjuga con enzimas lisosomales, mediante el entrecruzamiento del grupo *N*-hidroxisuccinimida éster con el término amino químicamente reactivo y uno o más residuos de lisina en las enzimas lisosomales, para formar uniones covalentes (de amida) estables. La figura 4 (B) muestra otros agentes entrecruzadores adecuados (*m*-Maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (MBS), Sulfo-*m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (sulfo-MBS), y Sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC)) que se pueden usar.
- La figura 5 muestra la caracterización de los péptidos IGF2 por cromatografía de fase inversa con C4. Se utilizó una columna analítica de fase inversa con C4, de 4,6 x 150 mm para evaluar la pureza y la conformación de la proteína del tipo natural y los péptidos de la variante IGF2. Las muestras de péptidos se cargaron en una columna C4 equilibrada con ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA) y acetonitrilo al 25 %. Después de 2 minutos, la columna se desarrolló usando un gradiente lineal de acetonitrilo al 25-35 %, durante un lapso de 10 minutos. La figura 5 (A) muestra que el péptido IGF2 humano del tipo natural recombinante se eluye aproximadamente a los 7,5 minutos, que corresponden al acetonitrilo al 30 %. La figura 5 (B) muestra el péptido de variante IGF2 humano recombinante que también se eluye aproximadamente a los 7,5 min que corresponden al acetonitrilo al 30 %. La figura 5 (C) muestra que el péptido de la variante IGF2 humano, modificado con PEG4-PFB se eluye aproximadamente a los 8

minutos, que corresponden al acetonitrilo al 31 %. Estos datos indican que los péptidos de la variante IGF2 y del tipo natural tienen conformaciones proteicas muy similares, puesto que se comportan de un modo casi idéntico en la cromatografía de fase inversa con C4. El desplazamiento en el tiempo de retención para el péptido de la variante IGF2 humano, modificado con PEG4-PFB indica que el péptido de la variante IGF2 se ha modificado por completo con el entrecruzador químico que alteró su interacción en la columna C4.

La figura 6 muestra la evaluación de rhGAA conjugado con el péptido de la variante IGF2 para la unión de receptores y la captación celular. El péptido de la variante IGF2 se modificó con el entrecruzador PEG4-PFB y posteriormente se acopló con rhGAA modificada con S-Hynic. La rhGAA conjugada con el péptido de la variante IGF2 resultante (designado como vIGF2-rhGAA) luego se purificó por cromatografía por exclusión de tamaños, para determinar si la conjugación química del péptido de la variante IGF2 mejora la afinidad de la rhGAA para el receptor de IGF2/CI-MPR, la unión de rhGAA y vIGF2-rhGAA no conjugados se comparó directamente al variar las concentraciones de proteína (0,003-10 µg/ml, correspondiente a 0,012-42 nM rhGAA) en ensayos de unión de placas de receptores, figura 6 (A). Se observaron cantidades significativamente mayores de actividad enzimática capturada para vIGF2-rhGAA que para el rhGAA no conjugado, en todas las concentraciones de proteínas probadas en estos ensayos de unión de placas de receptores de IGF2/CI-MPR. Estos resultados confirman que la conjugación de péptido IGF2 aumenta la afinidad de rhGAA para el receptor de IGF2/CI-MPR. Además, la inclusión del péptido IGF2 del tipo natural libre, reduce notablemente la captura de vIGF2-rhGAA reducida en estos ensayos de placas, indicando que la unión depende del péptido IGF2. Es posible que se requieran cantidades mucho mayores del péptido IGF2 del tipo natural libre para eliminar por completo la unión de vIGF2-rhGAA en estos ensayos de placas de receptores. Para determinar si una mayor afinidad de receptores conduciría a una mejor captación celular para vIGF2-rhGAA, se evaluó la internalización de rhGAA y vIGF2-rhGAA extracelular no conjugados en los mioblastos de los músculos del esqueleto de la rata L6, figura 6 (B). El vIGF2-rhGAA demostró internalizarse sustancialmente mejor que la rhGAA no conjugada en los mioblastos de L6 en todas las concentraciones de proteínas testeadas. Estos resultados demuestran el beneficio funcional de mejorar la afinidad de unión del receptor para optimizar la internalización y el suministro de enzimas lisosomales exógenas en las células diana.

La figura 7 muestra la caracterización del I2S conjugada con el péptido de la variante IGF2. El péptido de la variante IGF2 se modificó con el entrecruzador NHS-PEG4-azida y posteriormente se acopló a I2S modificada con fosfina. La I2S conjugada con el péptido de la variante IGF2 resultante (designado como vIGF2-I2S) se purificó por cromatografía por exclusión de tamaños. Para determinar si la conjugación química del péptido de la variante IGF2 mejora la afinidad de la I2S para el receptor de IGF2/CI-MPR, la unión de I2S y vIGF2-I2S no conjugados se comparó directamente en diversas concentraciones de proteínas (0,03-10 µg/ml) en ensayos de unión de placas de receptores, figura 7 (A). Se capturaron cantidades sustancialmente mayores de vIGF2-I2S en estos ensayos de unión de placas de receptores de IGF2/CI-MPR que la I2S no conjugada en todas las concentraciones de proteínas testeadas. Estos resultados de unión de los receptores son congruentes con los de vIGF2-rhGAA y demuestran que el mismo péptido de la variante IGF2 puede acoplarse químicamente a diferentes enzimas lisosomales para aumentar su afinidad de unión para el receptor de IGF2/CI-MPR. Para determinar si múltiples péptidos de la variante IGF2 pueden conjugarse químicamente con las enzimas lisosomales, se comparó la masa molecular de I2S y vIGF2-I2S no conjugados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), figura 7(B). La I2S no conjugada tenía un peso molecular aparente de aproximadamente 80 kDa (franja 1) en SDS-PAGE, mientras que el vIGF2-I2S tuvo un peso molecular aparente mucho mayor, de aproximadamente 120 kDa (franja 2). Estos datos indican que múltiples péptidos de la variante IGF2 deben de haberse conjugado químicamente en I2S para lograr un incremento de aproximadamente 40 kDa, puesto que la masa molecular para el péptido de la variante IGF2 es de solo ~8 kDa (franja 3). Estos resultados también demuestran que la I2S se convirtió completamente en vIGF2-I2S, con diversas cantidades de péptidos de la variante IGF2, tal como se evidencia por la amplia banda de proteínas en SDS-PAGE.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

El presente tema central puede comprenderse de un modo más sencillo haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, tomada con relación a las figuras y ejemplos adjuntos, que forman parte de esta invención.

También, como se emplea en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una/uno” y “el/la” incluyen el plural y la referencia a un valor numérico en particular incluye al menos ese valor particular, salvo que el contexto dicte claramente lo contrario. El término “pluralidad”, tal como se emplea en la presente, significa más de uno. Cuando se expresa un rango de valores, otra realización incluye desde ese valor en particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, por el uso de las frases “aproximadamente/alrededor de”, se entiende que el valor en particular forma otra realización. Todos los intervalos son inclusivos y combinables.

Se proveen ejemplos para facilitar la comprensión de las invenciones.

Los métodos adecuados para conjugar un péptido direccionador con una enzima lisosomal recombinante incluyen modificar el término amino (N) y uno o más residuos de lisina en una enzima lisosomal recombinante humana, usando un primer agente entrecruzador para generar una enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador, modificar el primer aminoácido en el término amino (N) de una región enlazadora de

corta extensión que precede a un péptido de la variante IGF-2, usando un segundo agente entrecruzador para generar un péptido de la variante IGF-2 modificado por el segundo agente entrecruzador, y luego conjugar la enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador con el péptido de la variante IGF-2 modificado por el segundo agente entrecruzador que contiene un enlazador corto.

- 5 Los enlazadores cortos adecuados pueden tener una extensión de 5 a 20 residuos de aminoácidos. El enlazador corto también puede tener alrededor de 10 aminoácidos de extensión. Los enlazadores cortos adecuados pueden estar representados por la secuencia de aminoácidos en la ID. DE SEC. N.º 3. Otros enlazadores cortos apropiados pueden proveerse usando un enlazador GS flexible, de 5 aminoácidos de extensión (glicina-glicina-glicina-glicina-serina), un enlazador de extensión de 10 aminoácidos que comprende 2 enlazadores GS flexibles, un enlazador de extensión de 15 aminoácidos, que comprende 3 enlazadores GS flexibles, un enlazador de 20 aminoácido de extensión que comprenden 4 enlazadores GS flexibles, o cualquiera de sus combinaciones.

15 Los métodos adecuados para preparar un péptidos direccionador conjugado con una enzima lisosomal recombinante, donde la enzima lisosomal modificada por un primer agente entrecruzador recombinante incluye usar una enzima lisosomal recombinante humana que se caracteriza por tener un término N químicamente modificado y uno o más residuos de lisina modificada que se modifican usando un primer agente entrecruzador. Las enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas incluyen: α -glucosidasa ácida humana (rhGAA), α -galactosidasa A ácida humana (GLA), β -glucuronidasa ácida humana (GUS), α -iduronidasa A ácida humana (IduA), iduronidato 2-sulfatasa ácida humana (I2S), β -hexosaminidasa A humana (HexA), β -hexosaminidasa B humana (HexB), α -manosidasa A ácida humana, β -glucocerebrosidasa humana (GlcCerase), lipasa ácida humana (LPA), y cualquiera de sus combinaciones. Uno o más residuos de lisina también pueden estar modificados en la enzima lisosomal recombinante humana. Los primeros agentes entrecruzadores adecuados incluyen succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-HyNic), sulfo- succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (sulfo-S-HyNic), o C6-succinimidil-6-hidrazinonicotinamida (C6-S-HyNic), o clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH), o clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH) o N-hidroxisuccinimida-éster-(PEG)_n-hidrazida, donde n está representado por 3-24 unidades de PEG para introducir partes de hidrazida en las enzimas lisosomales para el acoplamiento químico con péptidos direccionadores que contienen grupos reactivos aldehído. De un modo alternativo, las enzimas lisosomales pueden modificarse con N-hidroxisuccinimida éster-fosfina (NHS-fosfina), sulfo-NHS-fosfina, N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno) otros entrecruzadores heterobifuncionales de NHS-(PEG)_n-acetileno, donde "n" puede variar entre 3 y 24 unidades discretas de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno o entrecruzadores heterobifuncionales que contienen ciclooctinas, tales como difluorociclooctina (DIFO) y dibenzociclooctina (DIBO) o cualquiera de sus combinaciones para acoplar enzimas lisosomales químicamente modificadas con péptidos direccionadores químicamente modificados que contienen grupos reactivos azida. Los segundos agentes entrecruzadores adecuados para la modificación de péptidos direccionadores incluyen PEG4-pentafluorobecen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), o succinimidil-4-formilbenzoato (SFB), o C6-succinimidil-4-formilbenzoato (C6-SFB) para introducir grupos reactivos aldehído en los péptidos direccionadores para la conjugación con enzimas lisosomales que contienen grupos reactivos hidrazida. Los péptidos direccionadores también se pueden modificar con entrecruzadores heterobifuncionales, tales como N-hidroxisuccinimida éster-azida (NHS-azida) o, N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-azida (NHS-PEG4-azida) u otros entrecruzadores NHS-(PEG)_n-azida, donde n puede variar entre 3 y 24 unidades discretas de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-azida, o cualquiera de sus combinaciones para introduce grupos reactivos azida en los péptidos direccionadores para la conjugación con las enzimas lisosomales que contienen fosfinas reactivas o alquinos o grupos de ciclooctinas. En una realización preferida, el primer agente entrecruzador puede ser N-succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-HyNic) y el segundo agente entrecruzador puede ser PEG4-pentafluorobecen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB).

El término N y uno o más residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana pueden modificarse en un tampón ante la ausencia de aminas primarias, a un pH cercano a 7,3, a la temperatura ambiente aproximadamente, durante un período que ronda los 30 minutos. La enzima lisosomal recombinante humana puede intercambiarse rápidamente en un tampón ácido, después de modificar el término N y los residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana. Por ejemplo, el tampón ácido puede ser acetato de sodio 50 mM, a un pH cercano a 5,0. El tampón ácido puede ser acetato de sodio 0,1 M, acetato de potasio, citrato de sodio, MES, fosfato de sodio o fosfato de potasio a un pH aproximado de 5,0. El intercambio en un tampón ácido puede llevarse a cabo usando cromatografía por exclusión de tamaños, y el intercambio en un tampón ácido puede llevarse a cabo usando diálisis.

El péptido de la variante IGF-2 modificado por el segundo agente entrecruzador que contiene un enlazador corto puede purificarse antes de la conjugación con la enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador. La purificación puede llevarse a cabo usando filtración con gel, diálisis o cromatografía de fase inversa.

La conjugación de enzima lisosomal modificada con hidrazida recombinante humana con el péptido de la variante IGF-2 modificado con aldehído que contiene un enlazador corto puede llevarse a cabo en tampón ácido, a un pH aproximado de 5,0 en presencia de anilina. La conjugación de enzima lisosomal recombinante humana modificada con fosfina o acetileno o ciclooctina con péptido de la variante IGF-2 modificado con azida que contiene un enlazador corto puede llevarse a cabo en tampones cuyo pH varía entre 5,0 y 7,0. Un Péptido IGF-2 modificado con

la enzima lisosomal recombinante humana que contiene un enlazador corto conjugado puede purificarse usando cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis.

Un primer agente entrecruzador adecuado incluye succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), sulfo-succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (sulfo-S-HyNic), o C6-succinimidil-6-hidrazino-nicotinamida (C6-S-Hynic), o clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH), o clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH) o N-hidroxisuccinimida-éster-(PEG)_n-hidrazida, donde n está representado por 3-24 unidades de PEG, para introducir partes de hidrazida en enzimas lisosomales, para el acoplamiento químico con péptidos direccionadores que contienen grupos reactivos aldehído. De un modo alternativo, las enzimas lisosomales pueden modificarse con N-hidroxisuccinimida éster-fosfina (NHS-fosfina), sulfo-NHS-fosfina, N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno), otros entrecruzadores heterobifuncionales de NHS-(PEG)_n-acetileno, donde "n" puede variar entre 3 y 24 unidades discretas de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno, o entrecruzadores heterobifuncionales que contiene ciclooctinas, tales como difluorociclooctina (DIFO) y dibenzociclooctina (DIBO) o cualquiera de sus combinaciones para el acoplamiento de estas enzimas lisosomales químicamente modificadas con péptidos direccionadores que contienen grupos reactivos azida. Los segundos agentes entrecruzadores adecuados para modificar los péptidos direccionadores incluyen PEG4-pentafluorobecen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), o succinimidil-4-formilbenzoato (SFB), o C6-succinimidil-4-formilbenzoato (C6-SFB), o N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecane-azida (NHS-PEG4-azida), u otros entrecruzadores heterobifuncionales de NHS-(PEG)_n-azida, donde "n" puede variar entre 3 y 24 unidades discretas de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno, o entrecruzadores heterobifuncionales de NHS-(PEG)_n-acetileno, donde "n" puede variar entre 3 y 24 unidades de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno, y el segundo agente entrecruzador puede ser N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecane-azida (NHS-PEG4-azida). En otra realización adecuada, el primer agente entrecruzador puede ser N-hidroxisuccinimida éster-fosfina (NHS-fosfina) o sulfo-NHS-fosfina, y el segundo agente entrecruzador puede ser N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecane-azida (NHS-PEG4-azida). En otra realización adecuada, el primer agente entrecruzador puede ser N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno) u otros entrecruzadores heterobifuncionales de NHS-(PEG)_n-acetileno, donde "n" puede variar entre 3 y 24 unidades de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno, y el segundo agente entrecruzador puede ser N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecane-azida (NHS-PEG4-azida). En otra realización adecuada, el primer entrecruzamiento puede darse con ciclooctinas, tales como difluorociclooctina (DIFO) y dibenzociclooctina (DIBO), y el segundo agente entrecruzador puede ser N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecane-azida (NHS-PEG4-azida).

El término N y uno o más residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana pueden modificarse en un tampón que carece de aminos primarias a un pH aproximado de 7,3 a una temperatura cercana a la temperatura ambiente durante un lapso aproximado de 30 minutos. La enzima lisosomal recombinante humana puede intercambiarse rápidamente en un tampón ácido después de que el término N y los residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana se modifican. Un tampón ácido adecuado incluye acetato de sodio 50 mM, a un pH aproximado de 5,0. El tampón ácido puede ser acetato de sodio 0,1 M, acetato de potasio, citrato de sodio, MES, fosfato de sodio o fosfato de potasio a un pH aproximado de 5. El intercambio en un tampón ácido puede llevarse a cabo convenientemente, usando cromatografía por exclusión de tamaños o usando diálisis.

El péptido de la variante IGF-2 modificado por el segundo agente entrecruzador que contiene un enlazador corto puede purificarse antes de la conjugación con la enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador, empleando filtración con gel, diálisis o cromatografía de fase inversa. La conjugación de enzima lisosomal modificada con hidrazida recombinante humana con el péptido de la variante IGF-2 modificado con aldehído que contiene un enlazador corto puede llevarse a cabo en tampón ácido, a un pH aproximado de 5,0, en presencia de anilina. La conjugación de enzima lisosomal recombinante humana modificada con fosfina o acetileno o ciclooctina con el péptido de la variante IGF-2 modificado con azida, que contiene un enlazador corto, puede llevarse a cabo en tampones cuyo pH varía entre 5,0-7,0. El péptido IGF-2 modificado con la enzima lisosomal recombinante humana que contiene un enlazador corto conjugado se puede purificar usando cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis.

Tras la conjugación, la enzima lisosomal recombinante humana-péptido de la variante IGF-2 que contiene un enlazador corto puede purificarse usando cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis.

La conjugación de la enzima lisosomal recombinante humana modificada con el del primer agente entrecruzador (NHS-PEG4-acetileno) y el péptido de la variante IGF-2 modificado con el segundo agente entrecruzador (NHS-PEG4-azida) que contiene un enlazador corto en tampón ácido, a un pH aproximado de 5,0, puede llevarse a cabo en presencia de cobre (Cu⁺¹). Después de esta etapa de conjugación, puede llevarse a cabo una etapa de purificación del péptido IGF-2 modificado con la enzima lisosomal recombinante humana que contiene un enlazador corto conjugado, usando cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis.

La conjugación de la enzima lisosomal recombinante humana modificada con el primer agente entrecruzador (ciclooctina, tales como difluorociclooctina; DIFO) y el péptido de la variante IGF-2 modificado con el segundo agente entrecruzador (NHS-PEG4-azida) que contiene un enlazador corto, en tampón ácido, a un pH aproximado de 6,0. Después de esta etapa de conjugación, es posible realizar una etapa de purificación del péptido IGF-2 modificado con la enzima lisosomal recombinante humana que contiene un enlazador corto conjugado, usando cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis.

Las moléculas para la terapia de reemplazo enzimático pueden generarse conjugando un agente entrecruzador heterobifuncional con un péptido de la variante IGF-2 y luego conjugando el péptido de la variante IGF-2 modificado por un agente entrecruzador heterobifuncional con una enzima lisosomal recombinante humana. La molécula para la terapia de reemplazo enzimático también se puede preparar conjugando un agente entrecruzador heterobifuncional con una enzima lisosomal recombinante humana y luego conjugando la enzima lisosomal recombinante humana modificada por el agente entrecruzador heterobifuncional con un péptido de la variante IGF-2. Las enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas incluyen: α -glucosidasa A humana (rhGAA), α -galactosidasa A humana (GLA), β -glucuronidasa humana (GUS), α -iduronidasa A humana (IduA), iduronidato 2-sulfatasa humana (I2S), β -hexosaminidasa A humana (HexA), β -hexosaminidasa B humana (HexB), α -manosidasa A humana, β -glucocerebrosidasa humana (GlcCer), lipasa humana (LPA), o cualquiera de sus combinaciones. Los agentes entrecruzadores heterobifuncionales incluyen *m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (MBS), Sulfo- *m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (sulfo-MBS) o cualquiera de sus combinaciones. El péptido de la variante IGF-2-enzima lisosomal recombinante humana conjugado puede purificarse, opcionalmente, usando filtración con gel o diálisis.

Las enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas se pueden preparar usando levaduras. La enzima lisosomal recombinante humana preparada a partir de levadura puede tratarse usando endoglicosidasa F (EndoF) o endoglicosidasa H (EndoH) to remove N-glicanos. En otra realización adecuada, el tratamiento usando endoglicosidasa F (EndoF) o endoglicosidasa H (EndoH) puede tener lugar en un tampón con pH ácido. Los tampones con pH ácido adecuados incluyen acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0. Las reacciones pueden llevarse a cabo a una temperatura cercana a la temperatura ambiente. Tras el tratamiento usando endoglicosidasa F (EndoF) o endoglicosidasa H (EndoH), la enzima lisosomal recombinante humana puede purificarse opcionalmente, empleando cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis.

También se proveen conjugados de uno o más péptidos de la variante IGF-2 químicamente unidos a una enzima lisosomal recombinante humana. En estas realizaciones, la enzima lisosomal modificada por un primer agente entrecruzador recombinante puede ser una enzima lisosomal recombinante humana, y la enzima lisosomal recombinante humana puede tener uno o más residuos de lisina modificada, por ejemplo el término N puede estar químicamente modificado. Los péptidos de la variante IGF-2 adecuados comprenden una o más de las siguientes modificaciones con respecto a la secuencia IGF-2 nativa humana:

sustitución de arginina por ácido glutámico en la posición 6;

eliminación de aminoácidos 1-4 y 6;

eliminación de aminoácidos 1-4, 6 y 7;

eliminación de aminoácidos 1-4 y 6 y sustitución de lisina por treonina en la posición 7;

eliminación de aminoácidos 1-4 y sustitución de glicina por ácido glutámico en la posición 6 y sustitución de lisina por treonina en la posición 7;

sustitución de leucina por tirosina en la posición 27;

sustitución de leucina por valina en la posición 43;

sustitución de arginina por lisina en la posición 65;

y/o el péptido de la variante IGF-2 comprende una etiqueta de afinidad y/o una región de extensión enlazadora de al menos 5 aminoácidos que preceden al IGF-2.

Un péptido IGF-2 modificado adecuado se caracteriza porque puede ser modificado en el término N, en un tampón a un pH aproximado de 7,5.

Una enzima lisosomal recombinante humana adecuada incluye una α -glucosidasa humana (rhGAA). Otras enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas que se pueden usar en estos métodos incluyen α -galactosidasa A humana (GLA), β -glucuronidasa humana (GUS), α -iduronidasa A humana (IduA), human acid isuronidate 2-sulfatase (I2S), β -hexosaminidasa A humana (HexA), β -hexosaminidasa B humana (HexB), α -manosidasa A humana, β -glucocerebrosidasa humana (GlcCer), lipasa humana (LPA), o cualquiera de sus combinaciones. Las enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas se caracterizan por tener el término N modificado y al menos un residuo de lisina modificado.

Las enzimas lisosomales recombinantes modificadas con el primer agente entrecruzador adecuadas se pueden caracterizar por tener un agente entrecruzador derivado de un entrecruzador bifuncional amino-reactivo. Una enzima lisosomal modificada por un primer agente entrecruzador recombinante adecuada puede caracterizarse por comprender un agente entrecruzador derivado de succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), sulfo-succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (sulfo-S-HyNic), o C6-succinimidil-6-hidrazino-nicotinamida (C6-S-Hynic), o clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH) o clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH)

o cualquiera de sus combinaciones para introducir partes de hidrazida. De un modo alternativo, las enzimas lisosomales pueden modificarse con N-hidroxisuccinimida éster-fosfina (NHS-fosfina), sulfo-NHS-fosfina, *N*-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno) u otros entrecruzadores heterobifuncionales de NHS-(PEG)*n*-acetileno, donde "n" puede variar entre 3 y 24 unidades discretas de PEG, o entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno, o entrecruzadores heterobifuncionales que contienen ciclooctinas, tales como difluorociclooctina (DIFO) y dibenzociclooctina (DIBO) o cualquiera de sus combinaciones para acoplar estas enzimas lisosomales químicamente modificadas con los péptidos direccionadores que contienen grupos reactivos azida. El término N modificado y los residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana pueden caracterizarse por derivar de la amina primaria en el primer aminoácido (N-terminal) y residuos de lisina modificados en un tampón que carece de aminas primarias, a un pH aproximado de 7,3, a una temperatura cercana a la temperatura ambiente, durante un lapso aproximado de 30 minutos. Los péptidos de la variante IGF-2 también pueden incluir el péptido IGF-2 y un enlazador corto acoplado con un segundo agente entrecruzador. Un segundo agente entrecruzador adecuado puede ser PEG4-pentafluorobenzen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), para la conjugación con enzimas lisosomales modificadas con succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic). En una realización diferente, el segundo agente entrecruzador puede comprender NHS-PEG4-azida para la conjugación con enzimas lisosomales modificadas con fosfina. En otra realización, el segundo agente entrecruzador puede comprender N-hidroxisuccinimida éster-PEG4-azida (NHS-PEG4-azida) para la conjugación con enzimas lisosomales modificadas con acetileno. En otra realización más, el segundo entrecruzador puede comprender N-hidroxisuccinimida éster-PEG4-azida (NHS-PEG4-azida) para la conjugación con enzima lisosomal modificada con ciclooctina.

También se provee un péptido de la variante IGF-2 modificado por un agente entrecruzador heterobifuncional conjugado con una enzima lisosomal recombinante humana. El péptidos de la variante IGF-2 modificados por un agente entrecruzador heterobifuncional adecuados se caracterizan por derivar de un agente entrecruzador heterobifuncional conjugado con un péptido de la variante IGF-2. Una enzima lisosomal recombinante humana adecuada puede ser α -glucosidasa ácida humana (rhGAA), α -galactosidasa A ácida humana (GLA), β -glucuronidasa ácida humana (GUS), α -iduronidasa A ácida humana (IduA), iduronidato 2-sulfatasa ácida humana (I2S), β -hexosaminidasa A humana (HexA), β -hexosaminidasa B humana (HexB), α -manosidasa A ácida humana, β -glucocerebrosidasa humana (GlcCer), lipasa ácida humana (LPA). Un agente entrecruzador heterobifuncional adecuado incluye *m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (MBS y sulfo-*m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (sulfo-MBS), sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (sulfo-SMCC). Los conjugados también pueden estar sustancialmente puros, con menos del 10 por ciento de péptido IGF2 libre, sin conjugar. La pureza del conjugado se puede medir por absorbancia con proteína lisosomal a 280 nm y péptido IGF2 libre, a 214 nm, en fracciones provenientes de la cromatografía por exclusión de tamaños o con geles proteicos teñidos, usando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) o mediante el método de Western blot, después de SDS-PAGE y anticuerpos específicos para la detección de enzimas lisosomales o péptido IGF2. El conjugado también puede ser sustancialmente puro, con menos del 0,1 por ciento de péptido IGF2 libre, sin conjugar u otros contaminantes. La enzima lisosomal recombinante humana puede derivar convenientemente de levadura con N-glicanos de alto contenido de manosa o del tipo complejo. Las enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas derivadas de la levadura con N-glicanos del tipo complejo pueden usarse directamente para la conjugación con el péptido IGF2. Las enzimas lisosomales recombinantes humanas adecuadas con N-glicanos de alto contenido de manosa también se pueden tratar usando endoglicosidasa F (EndoF) o endoglicosidasa H (EndoH), para eliminar estos N-glicanos exóticos antes o después de la conjugación química. La enzima lisosomal recombinante humana puede derivar convenientemente de otros sistemas de expresión de la proteína, incluidas las células de los insectos, las células de las plantas, los hongos, los animales transgénicos y los sistemas de traducción *in vitro*.

La invención también se refiere a un conjugado que comprende un péptido de la variante IGF-2 preparado como se ha descrito antes, para usar en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal seleccionada entre: enfermedad de Pompe, enfermedad de Fabry y enfermedad de Gaucher, MPS I, MPSII, MPS VII, enfermedad de Tay Sachs, enfermedad de Sandhoff, α -manosidosis y enfermedad de Wohlman.

La invención también provee una composición de uno o más péptidos de la variante IGF-2 químicamente conjugados con una enzima lisosomal recombinante obtenida por un método como se ha descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Una enzima lisosomal recombinante humana modificada adecuada incluye α -glucosidasa ácida para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. La enzima lisosomal recombinante humana modificada también puede ser α -galactosidasa ácida A, para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. La enzima lisosomal recombinante humana modificada puede ser una β -glucocerebrosidasa ácida para el tratamiento de enfermedad de Gaucher. La enzima lisosomal recombinante humana modificada puede ser α -iduronidasa ácida para el tratamiento de mucopolisacaridosis I (MPS I). La enzima lisosomal recombinante humana modificada puede ser iduronidato-2-sulfatasa ácida para el tratamiento de la mucopolisacaridosis II (MPS II). La enzima lisosomal recombinante humana modificada también puede ser β -glucuronidasa ácida para el tratamiento de la mucopolisacaridosis VII (MPS VII). De un modo alternativo, la enzima lisosomal recombinante humana modificada puede ser β -hexosaminidasa A para el tratamiento de gangliosidosis GM2 (Tay-Sachs). En otra realización adecuada, la enzima lisosomal recombinante humana modificada puede ser β -hexosaminidasa B para el tratamiento de gangliosidosis GM2 (Sandhoff). En otra realización, la enzima lisosomal recombinante humana modificada puede

ser lipasa ácida para el tratamiento de la enfermedad de Wohlman. La enzima lisosomal recombinante humana modificada también puede ser α -manosidasa ácida para el tratamiento de α -manosidosis. Las composiciones que se proveen en la presente se pueden administrar en una cantidad variable entre aproximadamente 0,1 y alrededor de 1000 miligramos de conjugado por kilogramo de peso del paciente por mes. En otra realización adecuada, la composición puede administrarse en una cantidad de entre aproximadamente 1 y alrededor de 500 miligramos de conjugado por kilogramo de peso del paciente por mes.

Una secuencia de ADN adecuada que codifica un péptido de la variante IGF-2, que está optimizado para la expresión en el *E. coli* se provee como ID. DE SEC. N.º 1. Una secuencia de aminoácidos adecuada que representa un péptido de la variante IGF-2 se provee como ID. DE SEC. N.º 2. Una secuencia de aminoácidos adecuada que representa un enlazador de extensión se provee como ID. DE SEC. N.º 3. El péptido de la variante IGF2 empleado en los métodos puede tener la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º 2. En otra realización, el péptido de la variante IGF2 en los conjugados puede tener la secuencia de aminoácidos de ID. DE SEC. N.º 2.

Ejemplos y otras realizaciones ilustrativas

Se emplea un método de entrecruzamiento químico para conjugar péptidos de la variante IGF-2 humanos con las enzimas lisosomales, para desarrollar ERT novedosas y superiores, orientadas al tratamiento de diversos trastornos por depósito lisosomal (LSD, *lysosomal storage disorders*). Se espera que esta estrategia aumente la afinidad de unión de las ERT conjugadas con péptidos IGF2 para IGF-2/CI-MPR y mejoren la captación celular y el suministro de estas enzimas recombinantes a los lisosomas. Al proceder de este modo, se espera que estas ERT conjugadas con péptidos IGF2 sean más efectivas para limitar el sustrato acumulado en las células afectadas.

Diversas variantes diferentes de péptidos IGF-2 humanos pueden sintetizarse o expresarse (en células de mamíferos o en otros organismos), purificarse y con posterioridad, modificarse químicamente con entrecruzadores heterobifuncionales para la conjugación con enzimas lisosomales. Un péptido de la variante IGF-2 puede contener una modificación o combinaciones de las siguientes modificaciones: sustitución de arginina por ácido glutámico en la posición 6; eliminación de aminoácidos 1-4 y 6; eliminación de aminoácidos 1-4 y 6, 7; eliminación de aminoácidos 1-4 y 6 y sustitución de lisina por treonina en la posición 7; eliminación de aminoácidos 1-4 y sustitución de glicina por ácido glutámico en la posición 6 y sustitución de lisina por treonina en la posición 7; sustitución de leucina por tirosina en la posición 27; sustitución de leucina por valina en la posición 43; sustitución de arginina por lisina en la posición 65. La mayoría de estas modificaciones se han diseñado para reducir la afinidad de unión de los péptidos IGF-2 para los receptores de insulina e IGF-1 y para las proteínas de unión IGF séricas (IGFBP, *serum IGF binding proteins*) manteniendo al mismo tiempo una alta afinidad para IGF-2/CI-MPR. Los péptidos IGF-2 modificados también pueden contener una etiqueta de afinidad (por ejemplo, polihistidina; His tag) para la rápida purificación del péptido IGF-2 modificado, pueden expresarse como proteínas de fusión, con contrapartidas de proteínas solubles, un sitio de proteasa (por ejemplo, el sitio de proteasa optimizado del virus del grabado del tabaco (TEV, *tobacco etch virus*)) para la eliminación de la etiqueta de afinidad o contrapartida de la proteína de fusión, una región de extensión enlazadora de al menos cinco aminoácidos que preceden al IGF-2.

Los péptidos de la variante IGF-2 y las enzimas lisosomales recombinantes pueden acoplarse químicamente mediante dos estrategias principales. (A) Modificar de manera independiente el péptido IGF-2 con un entrecruzador heterobifuncional y la enzima lisosomal recombinante con un entrecruzador heterobifuncional diferente (tal como se describe en los ejemplos 1-3). Después de la purificación para eliminar el excedente, el entrecruzador no conjugado y los subproductos químicos, el péptido IGF2 químicamente modificado y la enzima lisosomal químicamente modificado se conjugan después entre sí, en una reacción química, final, para formar el conjugado péptido IGF2-enzima lisosomal y se purifica y almacena en un tampón de pH ácido, para mantener la actividad enzimática. (B) Conjugar químicamente el péptido IGF2 y la enzima lisosomal que emplea un solo entrecruzador heterobifuncional (tal como se describe en el ejemplo 4). El péptido IGF-2 se modifica químicamente con el entrecruzador heterobifuncional, en una condición de reacción de pH. Luego se incorpora la enzima lisosomal químicamente modificada y el pH se ajusta a una segunda condición de reacción del pH para conjugar el péptido IGF2 con la enzima lisosomal. El conjugado luego se purifica para eliminar el excedente, el entrecruzador heterobifuncional no conjugado y los subproductos químicos y se almacena en un tampón de pH ácido, para mantener la actividad enzimática.

El abordaje de acoplamiento químico anterior tiene ventajas notables para mejorar el direccionamiento de las proteínas para las terapias de reemplazo con enzimas lisosomales. Primero, la conjugación de los péptidos IGF-2 modificados aumenta la afinidad de unión de enzimas lisosomales para IGF-2/CI-MPR, sin requerir estructuras de carbohidratos de M6P especializadas. Segundo, a diferencia de las proteínas de fusión de IGF-2, que contienen un solo péptido IGF-2 por enzima lisosomal, esta estrategia puede unir múltiples péptidos IGF-2 modificados a las enzimas lisosomales para lograr una mayor afinidad para IGF-2/CI-MPR. Tercero, este abordaje se puede emplear para conjugar péptidos mezclados (péptido IGF2 y otros péptidos), a fin de mejorar el direccionamiento del fármaco hacia otros tejidos (por ejemplo, el cerebro). Cuarto, este abordaje puede utilizar enzimas lisosomales recombinantes producidas a partir de la mayoría de los sistemas de expresión eucarióticos, que incluyen aunque no taxativamente, las células de mamíferos, levaduras, células de insectos, células de plantas, animales transgénicos (por ejemplo, en los huevos de la gallina, la lecha, etc.). Las enzimas lisosomales recombinantes que contienen N-glicanos del tipo complejo (es decir, que derivan de sistemas de expresión de mamíferos, levadura con

procesamiento de N-glicanos que proveen N-glicanos complejos, animales transgénicos, etc.) pueden utilizarse directamente para el acoplamiento. Las enzimas portadoras de N-glicanos del tipo con un alto contenido de manosa (es decir, derivadas de levadura, líneas de células Lec1 de mamíferos, etc.) pueden someterse a desglicosilación (mediante endoglicosidasas, tales como EndoF o EndoH) antes o después del acoplamiento químico con los péptidos IGF-2 modificados (tal como se describe en el ejemplo 5). Quinto, los péptidos IGF-2 modificados pueden fabricarse en la mayoría de los sistemas de expresión, incluidas las bacterias, levaduras u otros sistemas fúngicos que permiten un abordaje económico para el escalamiento del proceso. Sexto, los mismos péptidos IGF-2 modificados pueden conjugarse con cualquier enzima lisosomal para mejorar el direccionamiento de las proteínas sin tener que crear proteínas de fusión individuales IGF2-enzima lisosomal. Séptimo, esta estrategia puede crear composiciones novedosas y superiores para las ERT, con el potencial de reducir los requisitos farmacológicos, disminuir los tiempos de infusión y reducir la inmunogenia.

Ejemplo 1

La α -glucosidasa ácida recombinante humana (rhGAA) derivada de la mayoría de los sistemas de fabricación de células de mamíferos contienen muy bajas cantidades de M6P, principalmente con N-glicanos del tipo complejo que no son adecuados para la unión de alta afinidad de rhGAA con IGF-2/CI-MPR. Este perfil de N-glicanos se asemeja al de las proteínas séricas y de este modo, permite que rhGAA tenga un perfil farmacocinético favorable (es decir, depuración más lenta) en la circulación. Por lo tanto, la rhGAA puede utilizarse para la conjugación con péptidos IGF-2 modificados para aumentar su afinidad por IGF-2/CI-MPR, a fin de mejorar el direccionamiento de las proteínas y la captación celular, para desarrollar una ERT superior con rhGAA. Específicamente, la rhGAA puede concentrarse hasta alcanzar una concentración de proteínas de 8-10 mg/ml e intercambiarse en tampones a un pH aproximado de 7,3 que carece de aminos primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,3/ NaCl 100 mM) y posteriormente modificarse con un exceso molar de 12 a 20 veces del entrecruzador heterobifuncional succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), a temperatura ambiente, durante un lapso aproximado de 30 min. En esta reacción, el grupo N-hidroxisuccinimida éster (NHS) químicamente reactivo de S-Hynic reacciona con el grupo α -amino del primer residuo de aminoácido en el término amino (N) y los grupos ϵ -amino de lisinas en la rhGAA para introducir los nuevos grupos hidrazida, químicamente activos en estos residuos de aminoácidos modificados. La rhGAA modificada con S-Hynic luego se intercambia rápidamente en tampón ácido (por ejemplo, NaOAc 50mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 0,05 %) mediante cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis, para eliminar el exceso de entrecruzador y los subproductos químicos y para preservar la actividad enzimática. Esta reacción química puede titularse con diversas cantidades de S-Hynic (por ejemplo, exceso molar 5-40X) para entender la relación de S-Hynic a rhGAA que rinde de un modo reproducible 1-4 grupos hidrazida químicamente activos en la rhGAA. Las condiciones óptimas se usan después para el escalamiento de la reacción de modificación con S-Hynic de rhGAA.

En una reacción separada, un péptido de la variante IGF2, tal como IGF-2 [del(1-4), Arg6, Leu27, Arg65] que contiene una región enlazadora de corta extensión (en el término N), se modifica químicamente usando el entrecruzador heterobifuncional PEG4-pentafluorobecen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), a un pH \sim 7,5, a temperatura ambiente durante 2-3 horas. En esta reacción, el PEG4-PFB modifica el grupo α -amino del primer aminoácido glicina de la región enlazadora de corta extensión, para introducir un nuevo grupo químico aldehído reactivo en el término amino. La modificación química del péptido de la variante IGF2 puede monitorizarse por cromatografía de fase inversa con C4 para evaluar el avance y la completitud de la modificación química, tal como se muestra en la figura 5. El Péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído se purifica luego por filtración con cromatografía con gel o diálisis para eliminar el exceso de entrecruzador y los subproductos químicos en un tampón apropiado para la conjugación (por ejemplo, NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 %). después se lleva a cabo una reacción final para conjugar la rhGAA modificada con S-Hynic con el péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído en NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/tampón Polysorbate-80 al 0,05 % durante un lapso de 24 horas, a temperatura ambiente. Esta química acopla los grupos hidrazida de la rhGAA modificada con S-Hynic con los grupos aldehído químicamente activos de los péptidos IGF2 modificados con PEG4-benzaldehído para formar uniones covalentes (de hidrazona) estables. Esta reacción puede llevarse a cabo en presencia de anilina (por ejemplo, 10 mM) con diversas cantidades de péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído (por ejemplo, 1-10X exceso molar) a fin de optimizar el acoplamiento. La rhGAA conjugada con el péptido IGF-2 se purifica luego por cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis, contra fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 % para eliminar el excedente de péptidos IGF-2 modificados con PEG4-benzaldehído y la rhGAA conjugada con el péptido de la variante IGF2 (vIGF2-rhGAA) se almacena en el mismo tampón, a 4 °C o congelada, a -20 °C o -70 °C.

Ejemplo 2

La α -glucosidasa ácida recombinante humana (rhGAA) derivada de sistemas de fabricación de mamíferos se utilizan para la conjugación con péptidos de la variante IGF-2, a fin de incrementar la afinidad para la IGF-2/CI-MPR, con el propósito de mejorar el direccionamiento de las proteínas y la captación celular, para desarrollar una ERT superior con rhGAA. Específicamente, se usa la química de reacción de *Ligadura Staudinger* (azida-fosfina) para acoplar los péptidos IGF2 con la rhGAA, con el propósito de genera un conjugado de péptido IGF2-rhGAA para mejorar el direccionamiento farmacológico. En este ejemplo, la rhGAA (a 5-10 mg/ml) se intercambia en tampones a un pH aproximado de 7,3, que carece de aminos primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,3)/NaCl 100 mM) y

con posterioridad se modifica con un exceso molar de 10 a 20 veces del entrecruzador heterobifuncional sulfo-*N*-hidroxisuccinimida éster-fosfina (sulfo-NHS-fosfina), a temperatura ambiente, durante un lapso aproximado de 30 minutos. En esta reacción química, el grupo NHS químicamente reactivo de sulfo-NHS-fosfina reacciona con el grupo α -amino del primer residuo de aminoácido en el término *N* y los grupos ϵ -amino de lisinas en la rhGAA para introducir nuevos grupos de fosfina químicamente activos en estos residuos de aminoácidos modificados. La rhGAA que contiene fosfina luego se intercambia rápidamente en tampón levemente ácido (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/NaCl 100 mM) mediante cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis para eliminar el exceso de entrecruzador y los subproductos químicos y para preservar la actividad enzimática. Esta reacción química puede titularse con diversas cantidades de sulfo-NHS-fosfina (por ejemplo, exceso molar 5-40X) para entender la relación de sulfo-NHS-fosfina con rhGAA, que rinde de un modo reproducible 1-4 grupos fosfina químicamente activos en la rhGAA. Pueden emplearse las condiciones óptimas para el escalamiento de la reacción de modificación con sulfo-NHS-fosfina de la rhGAA.

En una reacción separada, un péptido de la variante IGF-2, tal como IGF-2 [del(1-4), Arg6, Leu27, Arg65], que contiene una región enlazadora de corta extensión (en el término *N*), se modifica químicamente usando un exceso molar de 30 veces del entrecruzador heterobifuncional *N*-hidroxisuccinimida éster-PEG4-azida (NHS-PEG4-azida), en un tampón de pH \sim 7,5, que carece de aminos primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM/NaCl 50 mM, pH 7,5), a temperatura ambiente durante 1-3 horas. En esta reacción, el grupo NHS reactivo de NHS-PEG4-azida se hace reaccionar con el grupo α -amino de glicina de la región enlazadora de corta extensión, para introducir un nuevo grupo químico azida en el término *N*. La modificación química del péptido de la variante IGF2 puede monitorizarse por cromatografía de fase inversa con C4, para evaluar el avance y la completitud de la modificación química. El péptido IGF-2 modificado con PEG4-azida se purifica luego por cromatografía de fase inversa con C4 y el péptido modificado se liofiliza para eliminar los disolventes y almacenar como un polvo seco.

Después se lleva a cabo una reacción final para conjugar la rhGAA modificada con fosfina con el péptido IGF-2 modificado con PEG4-azida añadiendo directamente rhGAA modificada con fosfina (en fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/tampón de NaCl 100 mM) a este péptido IGF-2 modificado con PEG4-azida liofilizado, en una relación molar de 1 parte de rhGAA a 5 partes de péptido IGF2 con incubación a temperatura ambiente, durante un período de 24 horas. Esta química acopla el grupo químico azida del péptido IGF-2 modificado con azida a la rhGAA modificada con fosfina para formar uniones covalentes (de amida) estables. La rhGAA conjugada con el péptido de la variante IGF-2 (vIGF2-rhGAA) se purifica luego por cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis, para eliminar el excedente de péptidos IGF-2 modificados con PEG4-azida y se almacena en un tampón con pH levemente ácido (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/tampón de NaCl 100 mM) a 4 °C.

Ejemplo 3

La iduronidato 2-sulfatasa ácida recombinante humana (I2S) derivada de sistemas de fabricación de mamíferos se utiliza para la conjugación con los péptidos de la variante IGF-2 para incrementar la afinidad enzimática para IGF-2/CI-MPR, con el propósito de mejorar el direccionamiento de las proteínas y la captación celular, para desarrollar una ERT superior con I2S. Específicamente, se usa la química de reacción de *Ligadura de Staudinger* (azida-fosfina) para acoplar los péptidos de la variante IGF2 a la I2S, para generar un péptido IGF2-I2S conjugado, a fin de mejorar el direccionamiento farmacológico. En este ejemplo, la I2S (aproximadamente a 3 mg/ml) se modifica con un exceso molar de 20 veces del entrecruzador heterobifuncional sulfo-*N*-hidroxisuccinimida éster-fosfina (sulfo-NHS-fosfina), en un tampón con un pH \sim 7,3 que carece de aminos primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM /NaCl 100 mM, pH 7,3) a temperatura ambiente, durante un lapso aproximado de 30 minutos. En esta reacción química, el grupo NHS químicamente reactivo proveniente de la sulfo-NHS-fosfina reacciona con el grupo α -amino del primer residuo de aminoácido en el término *N* y los grupos ϵ -amino de las lisinas en la I2S para introducir nuevos grupos fosfina químicamente activos, en estos residuos de aminoácidos modificados. La I2S que contiene fosfina luego se intercambia rápidamente en tampón levemente ácido (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/NaCl 100 mM), mediante cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis, para eliminar el exceso de entrecruzador y los subproductos químicos y para preservar la actividad enzimática. Esta reacción química puede titularse con diversas cantidades de sulfo-NHS-fosfina (por ejemplo, exceso molar 5-40X), para entender la relación de sulfo-NHS-fosfina a I2S, que rinde de un modo reproducible 1-4 grupos fosfina químicamente activos en la I2S. Las condiciones óptimas pueden usarse para el escalamiento de la reacción de modificación de sulfo-NHS-fosfina de la I2S.

En una reacción separada, un péptido de la variante IGF-2, tal como IGF-2 [del(1-4), Arg6, Leu27, Arg65] que contiene una región enlazadora de corta extensión (en el término *N*), se modifica químicamente usando un exceso molar de 30 veces del entrecruzador heterobifuncional *N*-hidroxisuccinimida éster-PEG4-azida (NHS-PEG4-azida) en un tampón con un pH \sim 7,5 que carece de aminos primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM/NaCl 50 mM, pH 7,5), a temperatura ambiente, durante 1-3 horas. En esta reacción, el grupo NHS reactivo de NHS-PEG4-azida se hace reaccionar con el grupo α -amino de glicina de la región enlazadora de corta extensión, para introducir un nuevo grupo químico azida en el término *N*. La modificación química de péptido de la variante IGF2 puede monitorizarse por cromatografía de fase inversa con C4, para evaluar el avance y la completitud de la modificación química. El péptido IGF-2 modificado con PEG4-azida se purifica luego por cromatografía de fase inversa con C4 y el péptido se liofiliza y almacena con un polvo seco.

Después se lleva a cabo una reacción final para conjugar la I2S modificada con fosfina con el péptido IGF-2

modificado con PEG4-azida, añadiendo directamente la I2S modificada con fosfina (en fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/tampón de NaCl 100 mM) al péptido IGF-2 modificado con PEG4-azida liofilizado, en una relación molar de 1 parte de I2S a 5 partes de péptido IGF2, con incubación a temperatura ambiente, durante un período de 24 horas. Esta química acopla el grupo químico azida reactiva del péptido IGF-2 modificado con azida a la I2S modificada con fosfina, para formar uniones covalentes (de amida) estables. La I2S conjugada con el péptido de la variante IGF-2 (vIGF2-I2S) se purifica luego por cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis, para eliminar el excedente de péptidos IGF-2 modificados con PEG4-azida y se almacena en un tampón con pH levemente ácido (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/tampón de NaCl 100 mM), a 4 °C.

Ejemplo 4

Se utilizará la α -glucosidasa ácida recombinante humana (rhGAA) derivada de sistemas de fabricación de mamíferos para la conjugación con los péptidos IGF-2 modificados, para incrementar la afinidad para IGF-2/CI-MPR, con el propósito de mejorar el direccionamiento de las proteínas y la captación celular, para desarrollar una ERT superior con rhGAA. En este ejemplo, un péptido de la variante IGF2, tal como IGF-2 [del(1-4), Arg6, Leu27, Arg65], que contiene una región enlazadora de corta extensión con un residuo de cisteína en el término *N* se modifica con el entrecruzador heterobifuncional *m*-maleimidobenciol-*N*-hidroxisuccinimida éster (MBS), a un pH aproximado de 6 y a temperatura ambiente, durante 30-60 minutos. En esta reacción, el grupo maleimida químicamente reactivo de MBS reacciona con el grupo sulfhidrilo libre de la cisteína con terminal *N* al mismo tiempo que se preserva el grupo reactivo *N*-hidroxisuccinimida éster para el acoplamiento con la rhGAA. El péptido IGF-2 modificado con MBS se purifica de inmediato por filtración con cromatografía con gel o diálisis, para eliminar el excedente de MBS. La rhGAA se añade luego para el acoplamiento con el péptido IGF-2 modificado con MBS, a temperatura ambiente en un tampón que no contiene amina, a un pH de 7,3 durante 30 minutos. En esta reacción química, el grupo *N*-hidroxisuccinimida éster químicamente reactivo (del péptido IGF-2 modificado con MBS) reacciona con el grupo α -amino del primer residuo de aminoácido en el término *N* y los grupos ϵ -amino de las lisinas en la rhGAA, para formar enlaces covalentes estables. Esta reacción se titula usando diversas cantidades de péptido IGF-2 modificado con MBS (por ejemplo, exceso molar de 1-20X), para determinar el exceso molar de péptido IGF-2 modificado con MBS para acoplar 1-4 péptidos IGF-2 en la rhGAA. Las condiciones óptimas de acoplamiento luego se usan para el escalamiento de este proceso. La rhGAA conjugada con IGF-2 se purificará por filtración con cromatografía con gel o diálisis, para eliminar el excedente de péptidos IGF-2 y se almacena en un tampón de pH ácido (citrato de sodio 0,1M, tampón de pH 5,5).

Ejemplo 5

Las enzimas lisosomales recombinantes humanas, tales como rhGAA con estructuras de N-glicanos del tipo con alto contenido de manosa (derivadas de levadura, células de mamíferos Lec1 con deficiencia en GNT-1, etc.) pueden utilizarse para la conjugación con péptidos de la variante IGF-2, a fin de incrementar la afinidad para la IGF-2/CI-MPR, con el propósito de mejorar el direccionamiento de las proteínas y la captación celular, para desarrollar una ERT superior con rhGAA. En este ejemplo, la rhGAA (a razón de 8-10 mg/ml) se intercambia en tampones a un pH aproximado de 7,3 que carece de aminas primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,3)/NaCl 100 mM) y con posterioridad se modifica con un entrecruzador heterobifuncional, tal como *N*-succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), en un tampón con un pH \sim 7,3 que carece de aminas primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM/NaCl 0,1 M, pH 7,3) a temperatura ambiente, durante 30 minutos. La rhGAA modificada con hidrazida luego se intercambia rápidamente en tampón ácido (por ejemplo, NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 %), por cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis, para eliminar el exceso de entrecruzador y los subproductos químicos y para preservar la actividad enzimática.

En una reacción separada, un péptido de la variante IGF-2, tal como IGF-2 [del(1-4), Arg6, Leu27, Arg65], que contiene una región enlazadora de corta extensión (en el término *N*), se modifica químicamente usando un exceso molar de 30 veces del entrecruzador heterobifuncional PEG4-pentafluorobecen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), en un tampón con un pH \sim 7,5, que carece de aminas primarias (por ejemplo, fosfato de sodio 50 mM/NaCl 50 mM, pH 7,5) a temperatura ambiente, durante 1-3 horas. En esta reacción, el PEG4-PFB modifica el grupo α -amino de glicina de la región enlazadora de corta extensión, para introducir un nuevo grupo químico aldehído, en el término *N*. La modificación química de péptido de la variante IGF2 puede monitorizarse por cromatografía de fase inversa con C4 para evaluar el avance y la completitud de la modificación química. El péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído se purifica luego por filtración con cromatografía con gel o diálisis, para eliminar el exceso de entrecruzador y los subproductos químicos, en un tampón apropiado para la conjugación (por ejemplo, NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 %).

Después se lleva a cabo una reacción final para conjugar la rhGAA modificada con S-Hynic con el péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído en NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/tampón Polysorbate-80 al 0,05 %, durante un lapso de 24 horas, a temperatura ambiente. Esta química acopla los grupos hidrazida de la rhGAA modificada con S-Hynic a los grupos aldehído químicamente activos de los péptidos IGF2 modificados con PEG4-benzaldehído, a fin de formar uniones covalentes (de hidrazona) estables. Esta reacción puede llevarse a cabo en presencia de anilina (por ejemplo, 10 mM) con diversas cantidades de péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído (por ejemplo, exceso molar 1-10X), a fin de optimizar el acoplamiento. La rhGAA conjugada con el péptido de la variante IGF-2 (vIGF2-rhGAA) se purifica luego por cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis,

para eliminar el excedente de péptidos IGF-2 modificados con PEG4-azida, en un tampón de pH ácido (NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 %).

Los N-glicanos que tienen un alto contenido de manosa en la rhGAA son problemáticos porque se cree que estos carbohidratos hacen que la proteína se elimine rápidamente de la circulación mediante los macrófagos y los receptores de manosa esplénicos. Sin embargo, los N-glicanos que tienen un alto contenido de manosa pueden eliminarse de la rhGAA en condiciones nativas (es decir, condiciones no desnaturalizantes, que conservan la actividad catalítica) usando endoglicosidasa F (EndoF) o endoglicosidasa H (EndoH), en un tampón con pH ácido (por ejemplo, NaOAc 50 mM, pH 4,8/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 %), a temperatura ambiente. La rhGAA ha demostrado por medios experimentales que permanece soluble y que es completamente activa después de eliminar los N-glicanos (no se muestran los datos). La desglicosilación de rhGAA puede llevarse a cabo después de que la enzima se modifica con S-Hynic y se purifica (por cromatografía por exclusión de tamaños o diálisis para eliminar el exceso de entrecruzador). Esta estrategia permite la desglicosilación completa de la rhGAA durante 1-5 días, usando EndoF o EndoH, sin afectar la actividad enzimática. La rhGAA modificada con hidrazida desglicosilada luego se conjuga con los péptidos IGF-2 modificados con PEG4-benzaldehído. De un modo alternativo, la desglicosilación de rhGAA puede llevarse a cabo de manera concurrente, durante la conjugación del péptido IGF-2 modificado con PEG4-benzaldehído con la rhGAA modificada con hidrazida, usando altas concentraciones de EndoF o EndoH. La rhGAA conjugada con el péptido IGF2 y desglicosilada se purifica luego por filtración con cromatografía con gel o diálisis, para eliminar el excedente péptidos IGF-2 modificados con fosfina y se almacena en un tampón de pH ácido (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 %). El método ideal para eliminar N-glicanos con alto contenido de manosa de la rhGAA derivada de la levadura sería coexpresar EndoH en la enzima lisosomal para la desglicosilación *in vivo* antes de la purificación de las proteínas de la rhGAA. Esto generaría rhGAA desglicosilada que puede modificarse directamente y acoplarse a los péptidos direccionadores variantes, sin ningún procesamiento adicional.

Las estrategias anteriores permiten la eliminación de los N-glicanos no deseados de la rhGAA, para evitar las repuestas alérgicas e impedir la rápida eliminación de las proteínas, mientras mejora significativamente la afinidad de unión para la IGF-2/CI-MPR, con el propósito de mejorar el direccionamiento de las proteínas y la captación celular de las enzimas lisosomales conjugadas con el péptido IGF2. Lo más importante es que esta estrategia puede utilizar las enzimas lisosomales producidas de los sistemas no mamíferos y representan un abordaje mucho más económico para desarrollar ERT superiores.

Los ejemplos anteriores se han diseñado para aumentar la afinidad de las diferentes enzimas lisosomales para la IGF-2/CI-MPR, mediante la conjugación química de los péptidos IGF-2 modificados. Esta estrategia mejora el direccionamiento de las proteínas para las ERT actuales y futuras, a fin de desarrollar tratamientos superiores para los LSD.

Ejemplo 6

Se empleó un ensayo de unión al receptor de IGF2/CI-MPR para evaluar los efectos de la conjugación química del péptido IGF2 en la afinidad por los receptores para las enzimas lisosomales rhGAA e I2S. Este ensayo se ha diseñado para diferenciar las enzimas lisosomales con alta afinidad de unión para IGF2/CI-MPR de aquellos con unión baja a moderada dado que las enzimas lisosomales no unidas se eliminan por lavado durante el procesamiento. Además, como se usan diversas concentraciones de proteínas de las enzimas lisosomales para evaluar la unión, este ensayo puede determinar las concentraciones de proteínas requeridas para unirse al receptor, que se pueden utilizar para estimar la afinidad de unión para la preparación de cada enzima lisosomal. Específicamente, las enzimas lisosomales no modificadas y las enzimas lisosomales conjugadas con el péptido IGF-2 se diluyeron en serie en HEPES 40 mM (pH 6,7)/NaCl 150 mM /EDTA 10 mM y luego se incubaron en placas de 96 pocillos para ELISA que se recubrieron con el receptor de IGF2/CI-MPR (50 µl por pocillo de receptor, a razón de 6 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato; después se bloquearon con BSA al 2 % en solución salina tamponada con fosfato) durante 1 hora, a 30 °C. Las placas posteriormente se lavaron tres veces con el mismo tampón que contenía Tween-20 al 0,1% para eliminar las proteínas no ligadas. Las enzimas lisosomales ligadas luego se midieron según la actividad enzimática usando los sustratos fluorogénicos apropiados (por ejemplo, 4-metilumbelliferil- α -D-glucopiranosido (4-MU- α -Glc) para rhGAA) en un tampón para ensayos (NaOAc 50 mM, pH 4,8/BSA al 2 %/Triton X-100 al 0,02 %) a 37 °C durante 1 hora. Las muestras luego se transfirieron a unas placas nuevas de 96 pocillos, se añadió NaOH 0,1M para elevar el pH de la solución hasta 10,5 aproximadamente y las placas se leyeron en un lector de placas de fluorescencia a la excitación y longitudes de onda de emisión apropiadas (es decir, excitación de 370 nm, emisión de 460 nm para 4-MU). Nuestros resultados indican que se observaron cantidades mucho mayores de actividad enzimática ligada para vIGF2-rhGAA que con la rhGAA sin conjugar en todas las concentraciones de proteína probadas, tal como se muestra en la figura 6A. La unión de vIGF2-rhGAA a las placas de IGF2/CI-MPR se redujo significativamente por la inclusión de péptido IGF2 WT humano libre, lo cual indica que esta unión dependía del péptido IGF2. Es factible que se requieran cantidades mucho mayores de péptido IGF2 WT humano libre para completar el bloqueo de vIGF2-rhGAA a IGF2/CI-MPR. También se demostró que la conjugación química del péptido IGF2 en I2S aumenta sustancialmente la afinidad de unión de esa enzima para IGF2/CI-MPR (figura 7A). Además, se observaron cantidades similares de actividades de I2S ligada a 1 y 3 µg/ml para la I2S conjugada con el péptido IGF2- (vIGF2-I2S), lo cual indica que la unión el receptor se saturó.

Estos datos colectivos develaron varias características importantes del abordaje de conjugación con el péptido de la variante IGF2. (1) La estructura proteica del péptido de la variante IGF2 es apropiada para la unión de alta afinidad al receptor de IGF2/CI-MPR. Esta evaluación funcional es coherente con nuestros datos que surgen de la cromatografía de fase inversa con C4, que demuestran que los péptidos del tipo natural y de la variante IGF2 se unen y se eluyen en condiciones casi idénticas, tal como se muestra en la figura 5. Como las “huellas” de estos dos péptidos IGF2 casi no se pueden distinguir entre sí en la cromatografía de fase inversa con C4, deben ser muy similares en sus conformaciones proteicas. (2) La conjugación química del péptido de la variante IGF2 no afectó la actividad enzimática para rhGAA o I2S (los datos no se muestran). La utilización de una región enlazadora de extensión para el acoplamiento químico del péptido a las enzimas lisosomales probablemente proveyó una ligazón suficiente para la unión del péptido IGF2, a la vez que mantuvo la actividad enzimática. (3) El péptido de la variante IGF2 conjugado es estable y mantiene una adecuada estructura proteica en los tampones ácidos que se requieren para mantener las actividades de las enzimas lisosomales.

Por lo tanto, los datos colectivos muestran que la conjugación química del péptido IGF2 en las enzimas lisosomales (por ejemplo, rhGAA y I2S) puede por cierto aumentar significativamente en sus afinidades para el receptor de IGF2/CI-MPR receptor. Este abordaje en teoría, debería aplicarse en sentido general para la conjugación química de los péptidos de la variante IGF2 en cualquier proteína lisosomal y en otras proteínas no lisosomales para mejorar su afinidad de unión para la IGF2/CI-MPR.

Ejemplo 7

Para evaluar los efectos funcionales del péptido IGF2 para la captación celular de las enzimas lisosomales exógenas, la internalización de rhGAA conjugada con IGF2 (vIGF2-rhGAA) se evaluó en los mioblastos de los músculos esqueléticos de unas ratas L6. Resumiendo, los mioblastos L6 se expandieron en matraces T-75 para confluir en el medio DMEM que contenía suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) al 10 %, a 37 °C y un medio de CO₂ al 5 %. Las células se cosecharon vía tripsina/EDTA y se distribuyeron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos, a una densidad celular de 3×10^5 células por pocillo y se incubaron en un medio con DMEM/FBS al 10 %. Dos horas antes de la adición de las enzimas lisosomales, el medio agotado de DMEM/FBS al 10 % se reemplazó con un medio de captación de 2,5 ml (Ham F-12/FBS al 10 %/ PIPES2 mM, pH 6,7). La rhGAA no conjugada y vIGF2-rhGAA se diluyeron a 0,5 mg/ml con fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/NaCl 100 mM/Polysorbate-80 al 0,05 % y se esterilizó a través de un dispositivo centrífugo con filtro de 0,2 µm (Costar). La rhGAA no conjugada se añadió a las cavidades individuales a concentraciones finales de proteínas de 10-200 nM, mientras se adicionó vIGF2-rhGAA a 2-25 nM. Para garantizar que todas las cavidades tuvieran el mismo volumen y la correcta concentración de proteínas, se añadieron fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5/NaCl 100 mM/tampón Polysorbate-80 al 0,05 % para que el volumen total de enzima y tampón fuera de 0,2 ml para cada muestra. Tal como se muestra en la figura 6B, la internalización de vIGF2-rhGAA fue significativamente mejor que la rhGAA no conjugada, en todas las concentraciones de proteínas probadas. Estos resultados revelaron varios aspectos importantes en torno a vIGF2-rhGAA: (1) la estructura proteica de péptido de la variante IGF2 es suficiente para la unión de alta afinidad a los receptores de IGF2/CI-MPR de la superficie celular; (2) vIGF2-rhGAA se internalizó de manera eficiente en los mioblastos in L6 y se suministró a los lisosomas, puesto que los organelos intracelulares se aislaron con este protocolo; (3) el péptido de la variante IGF2 tiene una baja afinidad de unión a las proteínas de unión IGF séricas (IGFBPs) según se había previsto, puesto que vIGF2-rhGAA se internalizó en los mioblastos L6 en lugar de ligarse a las IGBP en el medio; (4) el acoplamiento químico de péptidos de la variante IGF2 no alteró la actividad enzimática de rhGAA.

Estos resultados demuestran a las claras que el acoplamiento químico de péptidos de la variante IGF2 en la rhGAA puede mejorar significativamente la afinidad de unión para IGF2/CI-MPR, lo cual se traduce de manera directa en una captación celular sustancialmente mejor de la enzima lisosomal en las células diana. Estos datos sugieren que vIGF2-rhGAA sería una ERT superior para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Ejemplo 8

Para determinar si múltiples péptidos IGF2 se conjugaban químicamente con las enzimas lisosomales, se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para separar las proteínas, según su tamaño y posteriormente, el gel se tiñó con azul de Coomassie modificado de las bandas de proteínas. Tal como se muestra en la figura 7B, el peso molecular de iduronidato 2-sulfatasa (I2S) recombinante humana del tipo natural aumentó significativamente de ~80 kDa a 120 kDa aproximadamente, después de la conjugación química del péptido de la variante IGF2. Estos datos muestran a las claras que múltiples péptidos de la variante IGF2 deben de haberse acoplado a la I2S, puesto que el peso molecular de péptido de la variante IGF2 es de aproximadamente 8 kDa solamente. El gel teñido de SDS-PAGE demuestra que hay una distribución de especies de vIGF2-I2S con diversas cantidades de péptido de la variante IGF2 unido, con un promedio de 5 péptidos unidos por molécula de I2S (correspondiente a un incremento de ~40 kDa, para lograr un peso molecular aproximado de 120 kDa en gel). Lo más importante, estos datos también resalta el potencial de este abordaje para el acoplamiento de múltiples péptidos diferentes en la misma enzima lisosomal. Por ejemplo, los péptidos de la variante IGF2 y otros péptidos direccionadores (por ejemplo, los péptidos que según se sabe, son transportados a través de la barrera hematoencefálica (BBB, *blood brain barrier*)) podrían acoplarse químicamente a la misma enzima lisosomal para dirigir a la enzima lisosomal hacia los tejidos viscerales (mediante el péptido IGF2) y hacia el cerebro y el sistema

nervioso central (mediante los péptidos que penetran la BBB). Por lo tanto, este abordaje tiene el potencial de subsanar las principales limitaciones de las actuales ERT.

Ejemplo 9

5 La ID. DE SEC. N.º 1 representa la secuencia de ADNc para el péptido IGF-2 marcado con 8XHis-tagged [(del 1-4)-Arg6-Leu27-Arg65] con una región enlazadora de extensión con terminal N y un sitio de reconocimiento de la proteasa del TEV (*optimizado para la expresión en el E. coli*).

ID. DE SEC. N.º 1:

```
atgggcagccaccaccaccatcatcaccaccacactagtgccggcgagaatctgtactttcagggcgggtggtggtag
cggcgggtggtggttagccgtaccctgtgtggtggcgaattggttgatacgtgcgaattcgtctgtggtgacgcgggtt
tccgtttctctcgtccggcgtcccgctgagccgtcgcagccgtggtatcgttgaagagtgcgtgttttcgtagctgc
gacctggctctgctggaaacctattgcgcgaccccgccacgtagcgaagtga
```

10 La ID. DE SEC. N.º 2: representa la secuencia de aminoácidos para el péptido de la variante IGF2 con la secuencia de extensión.

ID. DE SEC. N.º 2:

NH2-
GGGGSGGGGSRTLCCGGELVDLQFVCGDRGFLFSRSPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLA
LLETYCATPARSE-COOH

15 La ID. DE SEC. N.º 2 corresponde a un péptido de la variante IGF2 tras eliminar la etiqueta N-terminal 8X His mediante la proteasa del TEV. Este péptido de la variante IGF2 carece de los residuos 1-4, de modo que el residuo de serina N-terminal corresponde al residuo 5 de WT IGF2. Se sabe que la arginina sustituida por ácido glutámico en la posición 6 reduce sustancialmente la afinidad de unión del péptido IGF2 para las proteínas de unión IGF séricas (IGFBP). Se sabe que la sustitución de leucina por tirosina en la posición 27 reduce sustancialmente la afinidad de unión de péptido IGF2 para la insulina y los receptores de IGF1. Una sustitución de arginina conservadora para la
20 lisina en la posición 65 se utilizó para posibilitar la modificación química solo de la región enlazadora de extensión en el término N para la conjugación con las enzimas lisosomales. La región enlazadora de extensión N-terminal se representa mediante la ID. DE SEC. N.º 3.

ID. DE SEC. N.º 3:

GGGGSGGG

25 El residuo de glicina N-terminal en la ID. DE SEC. N.º 3 se usa para la modificación química para el acoplamiento con las enzimas lisosomales.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un péptido direccionador conjugado con una enzima lisosomal recombinante, método que comprende lo siguiente:

(a)

5 i. modificar el término amino (N) y uno o más residuos de lisina en una enzima lisosomal recombinante humana, usando un primer agente entrecruzador para generar una enzima lisosomal recombinante humana modificada por un primer agente entrecruzador;

10 ii. modificar el primer aminoácido de un enlazador corto en el término amino (N) en un péptido de la variante IGF-2, usando un segundo agente entrecruzador para generar un péptido de la variante IGF-2 modificado por el segundo agente entrecruzador y

iii. conjugar la enzima lisosomal recombinante humana modificada con el primer agente entrecruzador con el péptido de la variante IGF-2 que contiene un enlazador corto modificado por el segundo agente entrecruzador o

15 (b) conjugar un agente entrecruzador heterobifuncional con un péptido de la variante IGF-2; y conjugar el péptido de la variante IGF-2 modificado por un agente entrecruzador heterobifuncional con una enzima lisosomal recombinante humana, por reacción con el término N y uno o más residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana o

20 (c) conjugar un agente entrecruzador heterobifuncional con una enzima lisosomal recombinante humana por reacción con el término N y uno o más residuos de lisina en la enzima lisosomal recombinante humana; y conjugar la enzima lisosomal recombinante humana modificada por el agente entrecruzador heterobifuncional con un péptido de la variante IGF-2;

25 donde la enzima lisosomal recombinante humana se selecciona entre α -glucosidasa recombinante humana (rhGAA), α -galactosidasa A (GLA) recombinante humana, β -glucuronidasa ácida (GUS) recombinante humana, α -iduronidasa A (IduA) recombinante humana, isuronidato 2-sulfatasa (I2S) recombinante humana, β -hexosaminidasa A (HexA) recombinante humana, β -hexosaminidasa B (HexB) recombinante humana, α -manosidasa A recombinante humana, β -glucocerebrosidasa (GlcCer) recombinante humana, lipasa ácida recombinante humana (LPA) o cualquiera de sus combinaciones y

30 donde el primer agente entrecruzador se selecciona entre N- succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), sulfo-succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (sulfo-S-HyNic), C6-succinimidil-6-hidrazino-nicotinamida (C6-S-Hynic), clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH) clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH) o N-hidroxisuccinimida-éster-(PEG)_n-hidrazida, donde n está representado por 3-24 unidades de PEG; y el segundo agente entrecruzador se selecciona entre PEG4-pentafluorobencen-4-formilbenzoato (PEG4-PFB), succinimidil-4-formilbenzoato (SFB) y C6-succinimidil-4-formilbenzoato (C6-SFB) o

35 el primer agente entrecruzador se selecciona entre N-hidroxisuccinimida éster fosfina (NHS-fosfina), sulfo-N-hidroxisuccinimida éster-fosfina (sulfo-NHS-fosfina), N- hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno) o N- hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n acetileno, donde n representa 3-24 unidades de PEG, entrecruzadores heterobifuncionales escindibles, tales como NHS-PEG3-S-S-acetileno o entrecruzadores heterobifuncionales que contienen ciclooctinas, tales como difluorociclooctina (DIFO) y dibenzociclooctina (DIBO); y el segundo agente entrecruzador se selecciona entre N-hidroxisuccinimida éster-PEG4-azida (HS-PEG4-azida), N-hidroxisuccinimida éster azida (NHS-azida), N-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n azida, donde n representa 3-24 unidades de PEG, o NHS-PEG3-S-S-azida o

40 el agente entrecruzador heterobifuncional se selecciona entre m-maleimidobenciol-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), sulfo-m-maleimidobenciol-N-hidroxisuccinimida éster (sulfo-MBS) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC); y

45 donde el péptido de la variante IGF-2 comprende uno o más de las siguientes modificaciones con respecto a la secuencia IGF-2 nativa humana:

sustitución de arginina por ácido glutámico en la posición 6;

eliminación de aminoácidos 1-4 y 6;

eliminación de aminoácidos 1-4, 6 y 7;

eliminación de aminoácidos 1-4 y 6 y sustitución de lisina por treonina en la posición 7;

50 eliminación de aminoácidos 1-4 y sustitución de glicina por ácido glutámico en la posición 6 y

sustitución de lisina por treonina en la posición 7;

- sustitución de leucina por tirosina en la posición 27;
- sustitución de leucina por valina en la posición 43;
- sustitución de arginina por lisina en la posición 65;
- 5 y/o el péptido de la variante IGF-2 comprende una etiqueta de afinidad y/o una región de extensión enlazadora de al menos 5 aminoácidos que preceden al IGF-2.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el péptido de la variante IGF2 comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º 2.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el enlazador corto comprende 5 a 20 residuos de aminoácidos.
- 10 4. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el enlazador de extensión comprende la ID. DE SEC. N.º 3.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dos residuos de lisina están modificados en la enzima lisosomal recombinante humana.
- 15 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enzima lisosomal recombinante humana se prepara usando una levadura, células de insectos, células de plantas, hongos, animales transgénicos y en sistemas de traducción *in vitro*.
7. Un conjugado, que comprende uno o más péptidos de la variante IGF-2 químicamente conjugados con una enzima lisosomal recombinante humana, en el que el conjugado puede obtenerse mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y comprende lo siguiente:
- 20 una enzima lisosomal humana modificada en el término amino (N) y uno o más residuos de lisina mediante la conjugación con un enlazador; y
- un péptido de la variante IGF-2 que comprende un enlazador corto en el término amino, en el que el primer aminoácido del enlazador corto se conjuga con el enlazador;
- en el que la enzima lisosomal recombinante humana es tal como se define en la reivindicación 1;
- en el que el péptido de la variante IGF-2 es tal como se define en la reivindicación 1
- 25 en el que el enlazador es el producto de las reacciones del primer y del segundo agentes entrecruzadores, según se define en la reivindicación 1 o un entrecruzador heterobifuncional según se define en la reivindicación 1.
8. Un conjugado según la reivindicación 7, para usar en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal seleccionada entre la enfermedad de Pompe, la enfermedad de Fabry y la enfermedad de Gaucher, MPS I, MPS II, MPS VII, enfermedad de Tay Sachs, enfermedad de Sandhoff, α -manosidosis y enfermedad de Wohlman, en el que:
- 30 la enzima lisosomal recombinante humana modificada es α -glucosidasa ácida para el tratamiento de enfermedad de Pompe o
- la enzima lisosomal recombinante humana modificada es α -galactosidasa A ácida para el tratamiento de la enfermedad de Fabry o
- 35 la enzima lisosomal recombinante humana modificada es β -glucocerebrosidasa ácida para el tratamiento de enfermedad de Gaucher o
- la enzima lisosomal recombinante humana modificada es α -iduronidasa ácida para el tratamiento de la mucopolisacaridosis I (MPS I) o
- la enzima lisosomal recombinante humana modificada es iduronidato-2-sulfatasa ácida (I2S) para el tratamiento de mucopolisacaridosis II (MPS II) o
- 40 la enzima lisosomal recombinante humana modificada es β -glucuronidasa ácida para el tratamiento de la mucopolisacaridosis VII (MPS VII) o
- la enzima lisosomal recombinante humana modificada es β -hexosaminidasa A para el tratamiento de gangliosidosis GM2 (Tay-Sachs) o
- 45 la enzima lisosomal recombinante humana modificada es β -hexosaminidasa B para el tratamiento de gangliosidosis GM2 (Sandhoff) o
- la enzima lisosomal recombinante humana modificada es lipasa ácida para el tratamiento de la enfermedad de

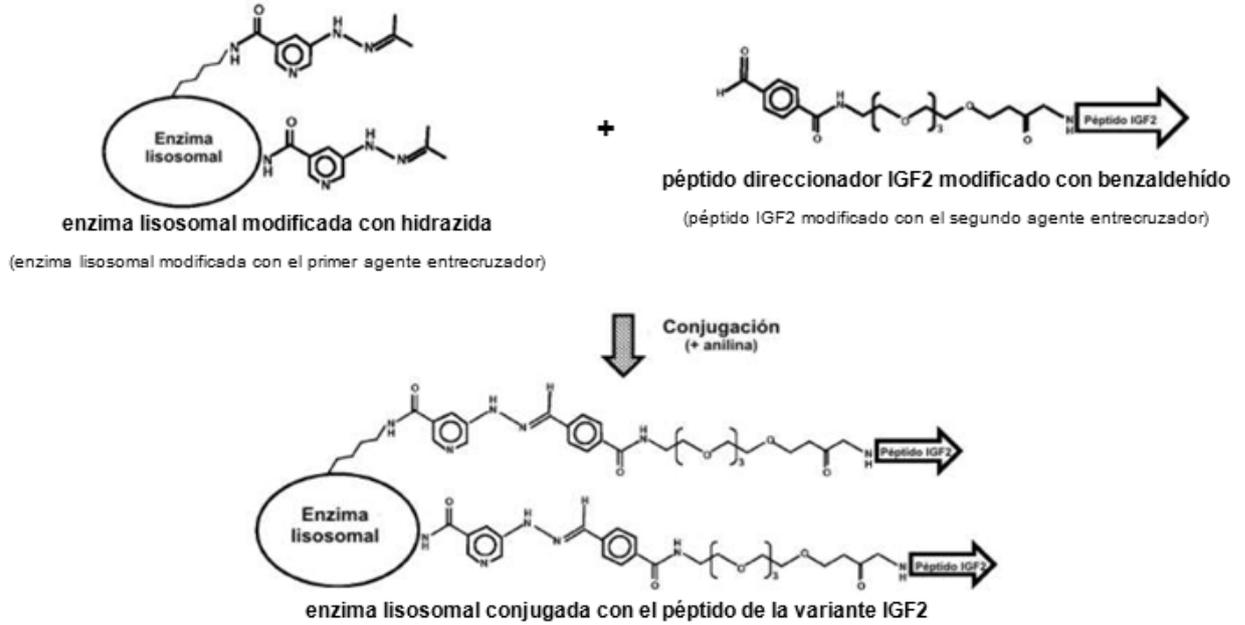
Wohlman o

la enzima lisosomal recombinante humana modificada es α -manosidasa ácida para el tratamiento de la α -manosidosis.

- 5 9. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado según la reivindicación 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

A



B

Primeros agentes entrecruzadores adecuados:

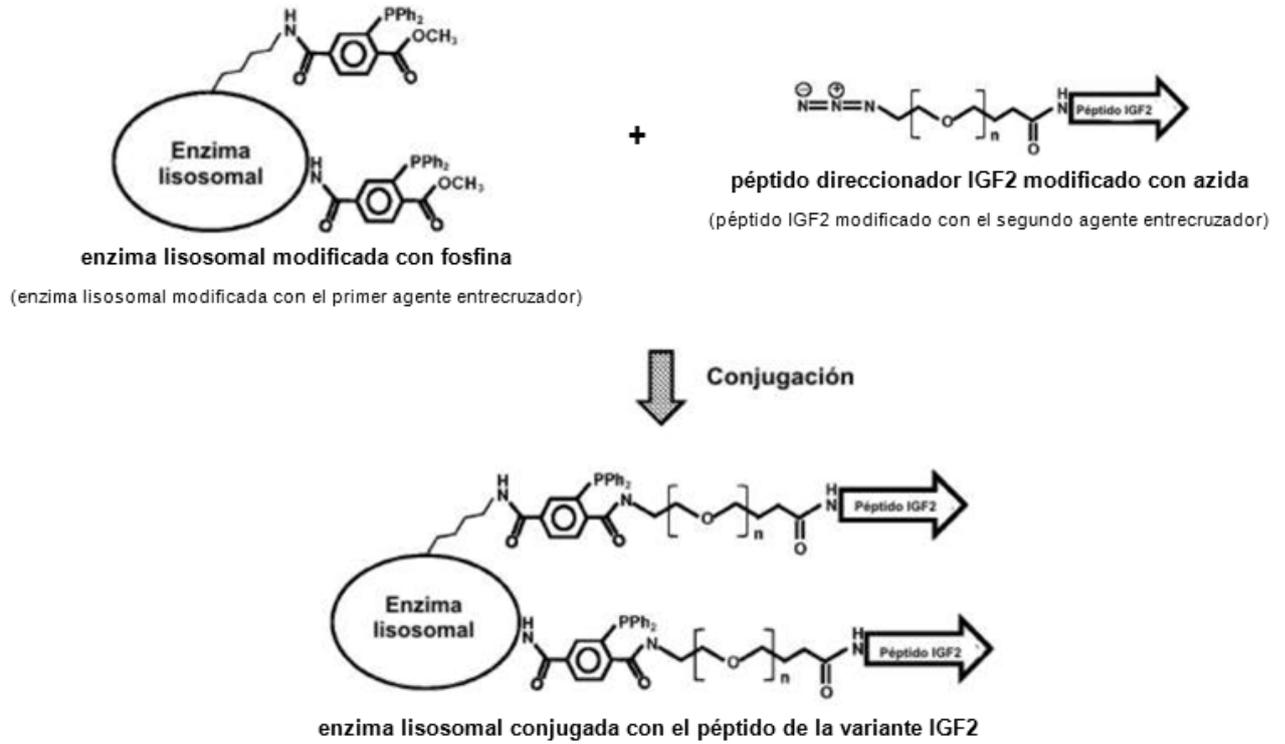
succinimidil-6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic)
 clorhidrato de succinimidil-4-hidrazidotereftalato (SHTH)
 clorhidrato de succinimidil-4-hidrazino nicotinato (SHNH)
 N-hidroxisuccinimida-éster-(PEG)n-hidrazida, donde n = 3-24 unidades de PEG

Segundos agentes entrecruzadores adecuados:

PEG4-pentafluorobencin-benzoato (PEG4-PFB)
 succinimidil-4-formilbenzoato (SFB)
 C6-succinimidil-4-formilbenzoato (C6-SFB)

Figura 2

A



B

Primeros agentes entrecruzadores adecuados:

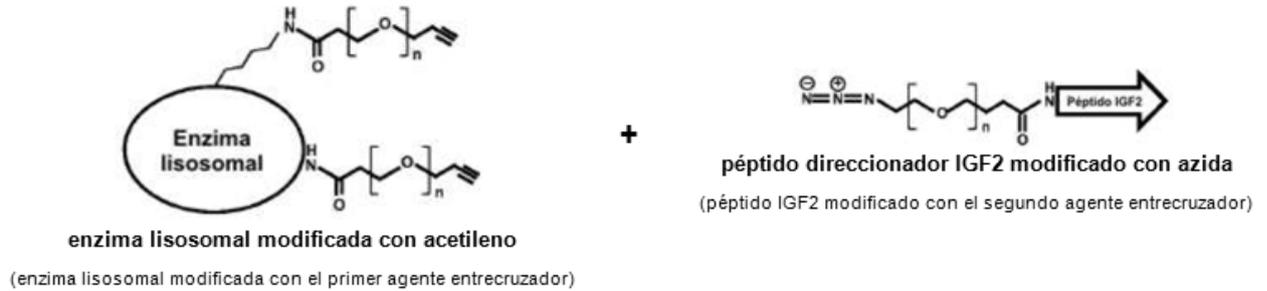
N-hidroxisuccinimida éster fosfina (NHS-fosfina)
sulfo-*N*-hidroxisuccinimida éster-fosfina (sulfo-NHS-fosfina)

Segundos agentes entrecruzadores adecuados:

N-hidroxisuccinimida éster azida (NHS-azida),
N-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n azida, donde n representa 3-24 unidades PEG,
NHS-PEG3-S-S-azida

Figura 3

A



B

Primeros agentes entrecruzadores adecuados:

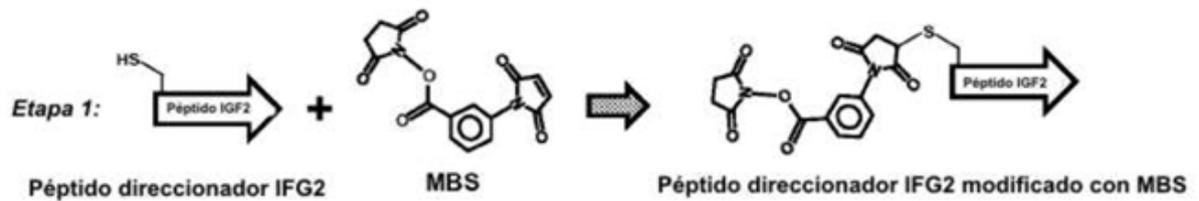
N-hidroxisuccinimida éster-tetraoxapentadecan-acetileno (NHS-PEG4-acetileno)
N-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n acetileno, donde n es 3-24 unidades de PEG
 NHS-PEG3-S-S-acetileno

Segundos agentes entrecruzadores adecuados:

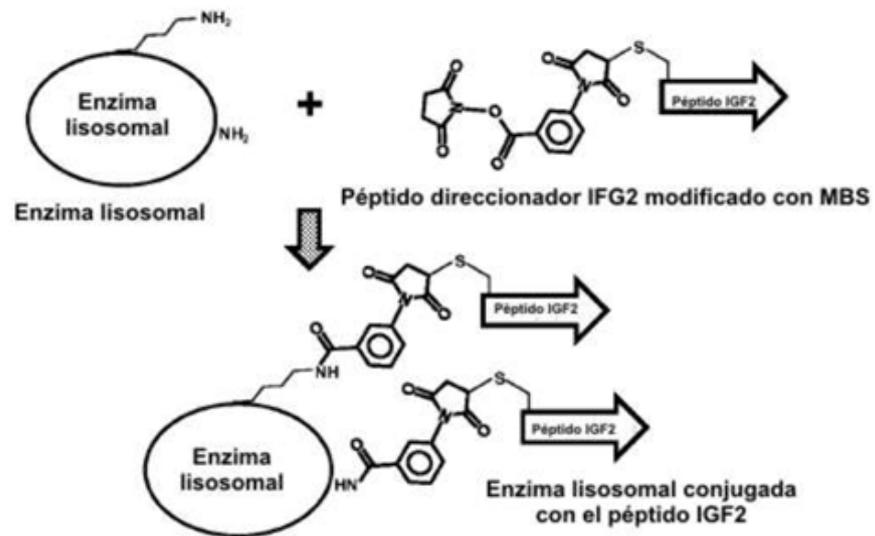
N-hidroxisuccinimida éster azida (NHS-azida),
N-hidroxisuccinimida éster-(PEG)_n azida, donde n representa 3-24 unidades PEG,
 NHS-PEG3-S-S-azida

Figura 4

A



Etapa 2:



B

m-maleimidobenciol-N-hidroxisuccinimida éster (MBS)
 Sulfo-*m*-maleimidobenciol-N-hidroxisuccinimida éster (sulfo-MBS)
 Sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC)

Figura 5

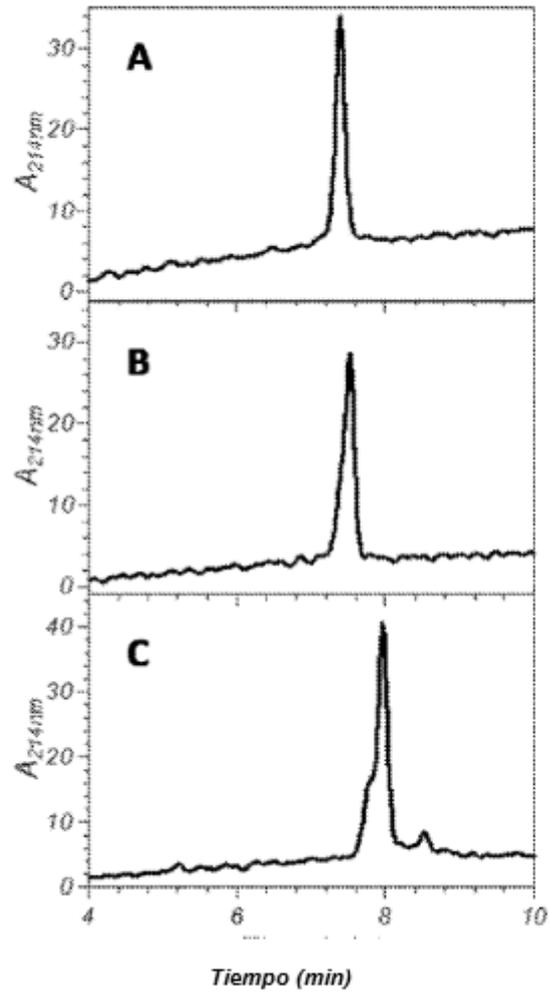
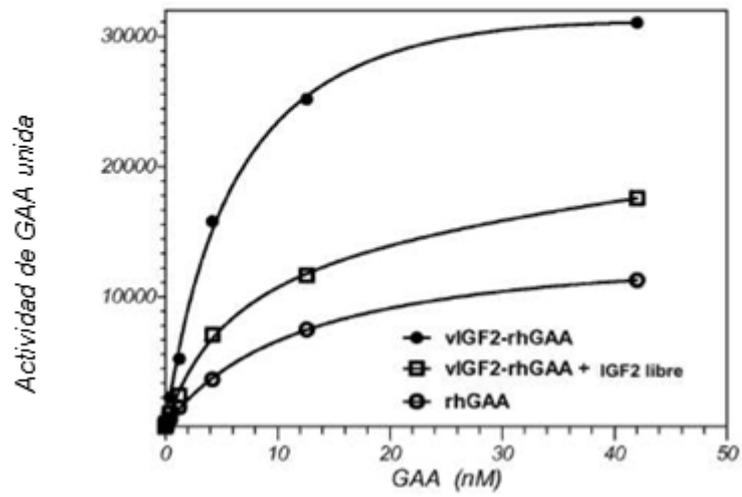


Figura 6

A

Ensayo de unión del receptor IGF2/CI-MPR



B

Captación de GAA en mioblastos L6

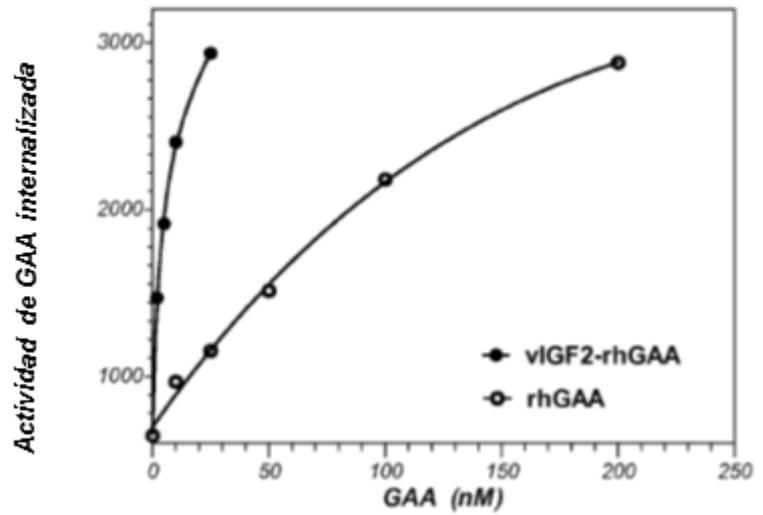
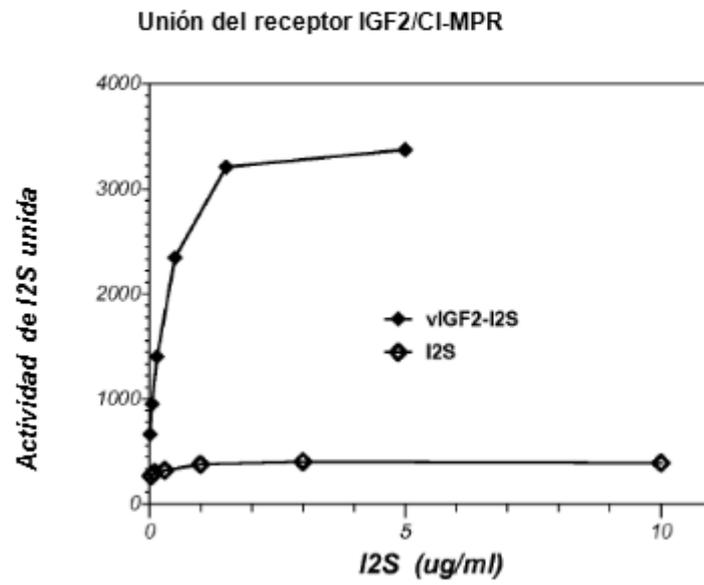


Figura 7

A



B

