

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 262**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/EP2015/057256**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15713502 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2970413**

54 Título: **Sulfamidasa modificada y producción de la misma**

30 Prioridad:

01.04.2014 EP 14162996

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

24.10.2018

73 Titular/es:

SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB (PUBL)
(100.0%)
112 76 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

BERGHARD, CHARLOTTA;
NORDLING, ERIK;
SVENSSON GELIUS, STEFAN y
TJERNBERG, AGNETA

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 687 262 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

Sulfamidasa modificada y producción de la misma

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a una sulfamidasa modificada, a composiciones que comprenden una sulfamidasa modificada y a métodos para producir una sulfamidasa modificada. Además, se describe el uso de una sulfamidasa modificada en terapia tal como en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal.

10

Antecedentes*Enfermedad por depósito lisosomal*

15 El compartimiento lisosomal funciona como una maquinaria catabólica que degrada el material de desecho en las células. La degradación se logra mediante varias hidrolasas y transportadores compartimentados específicamente para el lisosoma. Actualmente hay más de 40 enfermedades hereditarias identificadas en las que se ha establecido un vínculo entre la enfermedad y las mutaciones en los genes que codifican las proteínas lisosómicas. Estas enfermedades se definen como enfermedades por depósito lisosomal (LSD) y se caracterizan por una acumulación de un metabolito (o metabolitos) que no se puede degradar debido a la insuficiente capacidad de degradación. Como consecuencia del exceso de depósito lisosomal del metabolito, los lisosomas aumentan de tamaño. No se comprende por completo cómo el material de depósito acumulado causa la patología, pero puede implicar mecanismos tales como la inhibición de la autofagia y la inducción de la apoptosis celular (Cox & Cachón-González, J Pathol 226: 241-254 (2012)).

25

Terapia de reemplazo de enzimas

El depósito se puede reducir mediante la administración de una enzima lisosomal a partir de una fuente heteróloga. Está bien establecido que la administración intravenosa de una enzima lisosomal da como resultado su rápida captación por las células a través de un mecanismo llamado endocitosis mediada por receptores. Esta endocitosis está mediada por receptores sobre la superficie celular y, en particular, los dos receptores para fosfato manosa-6 (M6PR) han demostrado ser fundamentales para la captación de ciertas enzimas lisosomales (Neufeld; Birth Defects Orig Artic Ser 16: 77-84 (1980)). M6PR reconoce los oligomanosa glicanos fosforilados que son característicos de las proteínas lisosomales.

35

Basándose en el principio de la endocitosis mediada por receptores, las terapias de reemplazo enzimático (ERT) están actualmente disponibles para seis LSD (Gaucher, Fabrys, Pompe y Mucopolisacaridosis de tipo I, II y VI). Estas terapias son eficaces para reducir el depósito lisosomal en diversos órganos periféricos y mejora de este modo algunos síntomas relacionados con la patología.

40

Sin embargo, la mayoría de las LSD causan un depósito lisosomal en el sistema nervioso central (SNC) y, en consecuencia, presentan un repertorio de signos y síntomas relacionados con el SNC. Un inconveniente principal con la ERT administrada por vía intravenosa es la mala distribución al SNC. El SNC está protegido de la exposición a compuestos transmitidos por la sangre por la barrera hematoencefálica (BHE), formada por el endotelio del SNC.

45

Las células endoteliales de la BHE presentan uniones estrechas que evitan el paso paracelular, muestran una endocitosis pasiva limitada y además carecen de parte de la capacidad transcitótica mediada por receptores que se observa en otros tejidos. Particularmente, en ratones, el transporte mediado por M6PR a través de la BHE solo se observa hasta dos semanas después del nacimiento (Urayama et al, Mol Ther 16: 1261-1266 (2008)).

50 *Glucosilación de enzimas lisosomales*

En general, las N-glucosilaciones pueden producirse en un motivo de secuencia de Asn-X-Ser/Thr. En este motivo, la estructura núcleo inicial del N-glicano se transfiere por la glucosiltransferasa oligosacariltransferasa dentro del lumen reticular. Esta base común para todos los glicanos unidos a N está compuesta por 14 residuos; 3 glucosa, 9 manosa y 2 N-acetilglucosamina. Este ancestro se convierte entonces en tres tipos generales de N-glicanos; oligomanosa, complejo e híbrido (Figura 7), por las acciones de una multitud de enzimas que tanto recortan el núcleo inicial como añaden nuevos restos de azúcar. Cada N-glicano maduro contiene el núcleo común Man(Man)₂-GlcNAc-GlcNAc-Asn, donde Asn es el punto de unión a la proteína.

55

Además, las proteínas dirigidas al lisosoma llevan uno o más N-glicanos que están fosforilados. La fosforilación se produce en el aparato de Golgi y se inicia mediante la adición de N-acetilglucosamina-1-fosfato a C-6 de residuos de manosa de oligomanosa tipo N-glicanos. La N-acetilglucosamina se escinde para generar residuos de Manosa-6-fosfato (M6P), que son reconocidos por los M6PR e iniciarán el transporte de la proteína lisosomal al lisosoma. El N-glicano resultante se recorta entonces hasta el punto donde la M6P es el grupo terminal de la cadena de N-glicanos. (Essentials of Glycobiology. 2ª edición. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al, editores. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.)

El sitio de unión del M6PR requiere un grupo terminal de M6P que esté completo, ya que tanto el resto de azúcar como el grupo de fosfato están implicados en la unión al receptor (Kim et al, Curr Opin Struct Biol 19(5):534-42 (2009)).

Terapia de reemplazo enzimático dirigido al cerebro por modificación de glicanos

Una estrategia potencial para aumentar la distribución de la enzima lisosomal al SNC se ha descrito en el documento WO 2008/109677. En esta solicitud publicada, se describe la modificación química de β -glucuronidasa usando *meta*-peróxido de sodio y borohidruro de sodio (véase también Grubb et al, Proc Natl Acad Sci USA 105: 2616-2621 (2008)). Esta modificación, que consiste en oxidación con peróxido de sodio 20 mM durante 6,5 h seguida de inactivación, diálisis y reducción con borohidruro de sodio 100 mM durante una noche (denominado en lo sucesivo en el presente documento método conocido), mejoró sustancialmente la distribución de β -glucuronidasa al SNC y dio como resultado la depuración del depósito neuronal en un modelo murino de la LSD mucopolisacaridosis VII. Aunque el mecanismo subyacente de la distribución cerebral no está claro, se observó que la modificación química alteraba la estructura del glicano en la β -glucuronidasa y además se demostró que la endocitosis mediada por receptores mediante M6PR se reducía fuertemente.

La estrategia de modificación química se ha investigado para determinar otras enzimas lisosomales. Por ejemplo, la modificación de acuerdo con el método conocido no mejoró la distribución al cerebro de la proteasa tripeptidil peptidasa I administrada por vía intravenosa (Meng et al, PLoS One (2012)). Tampoco se han demostrado resultados satisfactorios para la sulfamidasa. La sulfamidasa, modificada químicamente de acuerdo con el método conocido, de hecho mostró un aumento de la semivida en ratones pero ningún efecto en el cerebro de ratones con MPS IIIA. La sulfamidasa modificada químicamente no se distribuyó al parénquima cerebral cuando se administró repetidamente mediante administración intravenosa (Rozaklis et al, Exp Neurol 230: 123-130 (2011)).

Por lo tanto, todavía no hay una ERT eficaz para el tratamiento de LSD con compromiso neurológico, tal como MPS IIIA. Los nuevos compuestos de sulfamidasa que pueden transportarse a través de la BHE mientras permanecen activos enzimáticamente serán de gran valor en el desarrollo de compuestos administrados por vía sistémica para terapias de reemplazo enzimático para el tratamiento de LSD con patología relacionada con el SNC, tal como MPS IIIA.

40 Descripción de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos compuestos de sulfamidasa que permitan el desarrollo de una terapia de reemplazo enzimático para LSD tal como MPS IIIA.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un nuevo compuesto de sulfamidasa que pueda transportarse a través de la barrera hematoencefálica en mamíferos y que pueda presentar una actividad enzimática (catalítica) en el cerebro de dicho mamífero.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un nuevo compuesto de sulfamidasa que presente una estabilidad mejorada.

Estos y otros objetos, que serán evidentes para un experto en la técnica a partir de la presente descripción, se logran mediante los diferentes aspectos de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas y como se describe en general en el presente documento.

En un aspecto de la invención, se proporciona una sulfamidasa modificada que no comprende sustancialmente epítopos para receptores de reconocimiento de glicano, en la que los restos de glicano naturales de dicha sulfamidasa se interrumpen mediante rupturas de enlace sencillo y rupturas de dobles enlaces, siendo la extensión de las rupturas de enlace sencillo por rupturas de enlace total de al menos el 60 % en oligomanosa glicanos,

permitiendo de ese modo el transporte de dicha sulfamidasa a través de la barrera hematoencefálica de un mamífero, en el que dicha sulfamidasa tiene actividad catalítica en el cerebro de dicho mamífero.

La sulfamidasa modificada de acuerdo con la invención se modifica de este modo, ya que los epítomos para los receptores de reconocimiento de glicano se han eliminado, por ejemplo, en comparación con una sulfamidasa no modificada (SEQ ID NO:1). Como se ha demostrado por el solicitante, por ejemplo, en los ejemplos adjuntos, tal sulfamidasa modificada es menos propensa a la captación celular que es consecuencia de la eliminación de epítomos para receptores de reconocimiento de glicano tales como los dos receptores para manosa-6 fosfato (M6PR) (véanse los Ejemplos 6 y 7). La ausencia casi completa de dichos epítomos reduce la afinidad de la sulfamidasa modificada con respecto a los receptores de reconocimiento de glicano. En particular, esto podría reducir la endocitosis mediada por receptores de la sulfamidasa modificada en el tejido periférico, lo que a su vez puede dar como resultado una depuración reducida de sulfamidasa modificada del plasma cuando, por ejemplo, se administra por vía intravenosa a un mamífero. Esto es probablemente al menos en parte debido a la inhibición de la captación mediada por receptor en el tejido periférico después de la modificación química de la sulfamidasa (como se demuestra en los estudios de captación celular del Ejemplo 6). Desde una perspectiva de dosificación, la depuración reducida de sulfamidasa modificada puede permitir ventajosamente el desarrollo de medicamentos de acción prolongada que pueden administrarse a pacientes con menos frecuencia.

Por receptores de reconocimiento de glicano se refiere a receptores que reconocen y se unen a proteínas principalmente a través de restos de glicano de las proteínas. Dichos receptores pueden, además de los receptores para manosa-6-fosfato, ilustrarse por el receptor de manosa; que se une selectivamente a las proteínas donde los glicanos presentan residuos de manosa terminales expuestos. Las lectinas constituyen otra gran familia de receptores de reconocimiento de glicano que pueden ilustrarse por la galactosa terminal que reconoce el receptor 1 de asialoglicoproteína que reconoce residuos de galactosa terminales en glicanos. Por lo tanto, los epítomos para receptores de reconocimiento de glicano pueden entenderse como (parte de) restos de glicano reconocidos por dichos receptores.

En este contexto, una sulfamidasa modificada que no comprende sustancialmente epítomos para receptores de reconocimiento de glicano debería entenderse preferiblemente como una sulfamidasa modificada que no comprende casi ningún epítomo para receptores de reconocimiento de glicano, o solo cantidades menores de dichos epítomos. En realizaciones preferidas, la sulfamidasa modificada no comprende epítomos (detectables) para receptores de reconocimiento de glicano. En particular, la sulfamidasa modificada no comprende restos de manosa-6-fosfato (detectables), restos de manosa o restos de galactosa que constituyen epítomos para el M6PR endocítico de tipo 1 y 2, el receptor de manosa y el receptor de galactosa, respectivamente. En una realización, por lo tanto, dichos epítomos pueden reconocerse por al menos un receptor de reconocimiento de glicano seleccionado de M6PR de tipo 1 y 2, un receptor de manosa y un receptor de galactosa. En particular, dicho al menos un receptor de reconocimiento de glicano puede seleccionarse de M6PR de tipo 1 y 2. En correspondencia con lo definido anteriormente, dichos epítomos, que se encuentran en restos de glicanos naturales, representan al menos un tipo de resto seleccionado de un resto de manosa-6-fosfato, un resto de manosa y un resto de galactosa. En realizaciones particulares, están ausentes de la sulfamidasa modificada como se describe en el presente documento.

Además, la sulfamidasa modificada de acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento no solo se distribuye al cerebro de un mamífero, sino que también desempeña una actividad enzimática (conservada) o actividad catalítica en el cerebro de dicho mamífero. La actividad enzimática de la sulfamidasa modificada se conserva al menos parcialmente a partir de una forma no modificada de la sulfamidasa. La actividad enzimática además se conserva en comparación con una sulfamidasa modificada de acuerdo con los métodos de la técnica anterior que no muestra actividad (ni distribución) enzimática en el cerebro de los ratones. Por lo tanto, la sulfamidasa modificada como se describe en el presente documento puede afectar al depósito lisosomal en el cerebro de mamíferos, tal como para disminuir el depósito lisosomal, por ejemplo, el depósito lisosomal de hexosamina N-sulfato [α -1, 4] ácido urónico (HNS-UA) como se demostró, por ejemplo, en el Ejemplo 8. La actividad catalítica conservada puede depender, por ejemplo, del nivel de conservación frente a la modificación de un residuo de aminoácido catalítico en el sitio activo de sulfamidasa.

La sulfamidasa pertenece a la familia de proteínas de las sulfatasas. Las sulfatasas son una familia de proteínas de origen evolutivo común que catalizan la hidrólisis de enlaces de éster sulfato a partir de una diversidad de sustratos. Por lo tanto, la "actividad catalítica" de la sulfamidasa modificada como se usa en el presente documento puede referirse a la hidrólisis de enlaces de éster sulfato, preferiblemente en lisosomas de tejido periférico y/o en lisosomas en el cerebro de un mamífero. La actividad catalítica de la sulfamidasa modificada puede dar como resultado una reducción del depósito lisosomal, tal como el depósito de heparán sulfato, en el cerebro de un mamífero que padece

una enfermedad por depósito lisosomal. La actividad catalítica puede medirse, por ejemplo, en un modelo animal, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 8.

Las sulfatasas comparten un pliegue común con una lámina β central que consiste en 10 cadenas β . El sitio activo de la sulfamidasa está situado en el extremo de la lámina β central y contiene una cisteína conservada en la posición 50 de la SEQ ID NO:1 que está modificada postraduccionalmente con respecto a una C α -formilglicina (FGly). Esta reacción tiene lugar en el retículo endoplasmático mediante la enzima de generación de FGly. Este residuo de FGly en la posición 50 (FGly50) está directamente implicado en la hidrólisis de enlaces de éster sulfato y la modificación parece necesaria para que las enzimas sean activas. Particularmente, la mutación de la cisteína conservada a una serina (Ser) en arilsulfatasa A y B evita la formación de FGly y produce enzimas inactivas (Recksiek et al, J Biol Chem 13; 273(11):6096-103 (1998)). Cuando se analiza en el presente documento la conservación del sitio activo, debe entenderse principalmente como la conservación de la FGly50 postraduccionales de SEQ ID NO:1. Por lo tanto, en tales casos, debe entenderse que la sulfamidasa modificada comprende un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia como se define a continuación con tal secuencia de aminoácidos.

En una realización, dicho sitio activo comprende un residuo catalítico en una posición correspondiente a la posición 50 de la SEQ ID NO:1 que proporciona dicha actividad catalítica. Este residuo catalítico es en una realización adicional FGly50.

En una realización, la sulfamidasa modificada tiene un contenido relativo de restos de glicano naturales de aproximadamente el 25 % del contenido de restos de glicano naturales en sulfamidasa recombinante no modificada. Dichos epítomos para receptores de reconocimiento de glicano pueden encontrarse, por lo tanto, en restos de glicanos naturales, y dichos restos de glicanos naturales están, por lo tanto, sustancialmente ausentes en la sulfamidasa modificada como se describe en el presente documento. El contenido relativo de restos de glicanos naturales en sulfamidasa modificada puede ser, en realizaciones preferidas, inferior al 25 %, tal como inferior al 20 %, tal como inferior al 15 %, tal como inferior al 10 %, tal como inferior al 5 %. En una realización particular, el contenido de restos de glicanos naturales es inferior al 1 %. El contenido relativo de los restos de glicano puede entenderse como el contenido de restos de glicanos naturales intactos después de la modificación de la sulfamidasa. Como se demuestra en los Ejemplos adjuntos, la cuantificación relativa de glucopéptidos puede basarse en LC-MS y áreas pico a partir de cromatogramas de iones reconstruidos. Los métodos de cuantificación alternativos se conocen por el experto en la técnica. Un contenido relativo de glicanos naturales a un nivel de menos del 25 % puede reducir ventajosamente la endocitosis mediada por receptores de sulfamidasa en las células a través de receptores de reconocimiento de glicanos, y mejorar el transporte a través de la barrera hematoencefálica. Un contenido relativo de glicanos naturales a un nivel del 25 % puede representarse, como se ilustra adicionalmente a continuación, por un glicano natural. Los restos de glicano naturales deberían entenderse a este respecto como restos de glicano que se producen de forma natural en la sulfamidasa que se modifican postraduccionalmente en el retículo endoplásmico y en los compartimentos de golgi de células eucariotas.

En la presente invención, dichos restos de glicano naturales se interrumpen mediante rupturas de enlace sencillo y rupturas de doble enlace en dicha sulfamidasa modificada, en donde predomina la interrupción de glicano por ruptura de enlace sencillo.

En realizaciones particulares, el grado de rupturas de enlace sencillo es de al menos el 65 %, tal como al menos el 70 %, tal como al menos el 75 %, tal como al menos el 80 %, tal como al menos el 82 %, tal como al menos el 85 % en el tipo oligomanosa de glicanos. El alcance de las rupturas de enlace sencillo frente a las rupturas de doble enlace puede medirse como se describe en los Ejemplos 10 y 11. Como se describe en otros aspectos en el presente documento, la sulfamidasa puede modificarse por reacción con peryodato para interrumpir la estructura de los restos de glicano que se producen naturalmente en la sulfamidasa. La estructura de glicano restante de la sulfamidasa modificada puede haberse interrumpido, al menos parcialmente, porque se ha producido al menos una escisión catalizada por peryodato, es decir, al menos una ruptura de enlace sencillo, en cada uno de los restos de glicano de origen natural. La "modificación" de dicha sulfamidasa modificada, en comparación con una sulfamidasa no modificada, se representa al menos parcialmente por dicha interrupción de restos de glicanos naturales.

En una realización, la sulfamidasa modificada comprende un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, o un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1. En un ejemplo no limitativo, dicho polipéptido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, tal como al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, tal como al menos un 98 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos

como se define en la SEQ ID NO:1. Por lo tanto, la sulfamidasa modificada puede comprender un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es muy similar a la SEQ ID NO:1. Sin embargo, dicho polipéptido puede extenderse, por ejemplo, por uno o más aminoácidos C y/o N-terminales, haciendo que la secuencia de sulfamidasa modificada real sea más larga que la secuencia de SEQ ID NO:1. De forma similar, en otros casos, la sulfamidasa modificada puede tener una secuencia de aminoácidos que es más corta que la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, siendo la diferencia en longitud, por ejemplo, debida a la delección o delecciones de uno o más residuos de aminoácidos en ciertas posiciones de la secuencia.

En una realización, dichos epítomos están ausentes al menos en cuatro de los cinco sitios de N-glucosilación: asparagina (N) en la posición 21 (N(21)), N en la posición 122 (N(122)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1. Formulada de forma alternativa, dicha sulfamidasa modificada comprende restos de glicanos naturales en no más de uno de dichos sitios de N-glucosilación. En ciertas realizaciones, dicha sulfamidasa modificada comprende restos de glicanos naturales en uno de dichos sitios de N-glucosilación; siendo dicho sitio de N-glucosilación opcionalmente N(131). Como alternativa, dichos epítomos, o restos de glicano, están ausentes en N(21), N(122), N(244) y N(393) de dicho polipéptido de sulfamidasa modificada. Las ventajas de dicha sulfamidasa modificada que carece de restos de glicano en los sitios identificados se han explicado anteriormente; es decir, la captación celular podría reducirse adicionalmente y el transporte a través de la barrera hematoencefálica podría facilitarse aún más.

En una realización, dichos restos de glicanos naturales de dicha sulfamidasa corresponden a la N-glucosilación en N en la posición 21 (N(21)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1. Por lo tanto, la sulfamidasa no modificada puede estar glucosilada naturalmente en estos cuatro sitios. En esta realización, la sulfamidasa modificada puede tener, por lo tanto, un contenido relativo de restos de glicanos naturales en estas posiciones que es de aproximadamente, o inferior al 25 % del contenido de restos de glicano en las posiciones correspondientes de sulfamidasa recombinante no modificada. En una realización particular de la sulfamidasa modificada, al menos tres de los cuatro sitios de glucosilación de origen natural identificados anteriormente carecen de epítomos para los receptores de reconocimiento de glicanos.

Como se ha mencionado anteriormente, el resto de glicano en el sitio de N-glucosilación N(131) de sulfamidasa es un resto de glicano que se produce naturalmente en la sulfamidasa recombinante no modificada. N(131) es el sitio de glucosilación en sulfamidasa que, una vez glucosilado, se considera que causa una mayor parte de la captación mediada por receptor en los tejidos periféricos en comparación con los demás sitios de glucosilación. La interrupción del resto de glicano que se produce naturalmente en N(131), que es de tipo oligomanosa, puede influir de este modo en la depuración de sulfamidasa modificada del plasma. La interrupción de dicha N(131) oligomanosa se puede caracterizar por una extensión de al menos el 60 % de rupturas de enlace sencillo. Por lo tanto, la interrupción por rupturas de enlace sencillo es más frecuente que la interrupción por rupturas de doble enlace.

En una realización, dichos epítomos están ausentes en cada uno de dichos cinco sitios de N-glucosilación de la sulfamidasa modificada. Por lo tanto, los restos de glicanos naturales están ausentes en los cinco sitios de N-glucosilación: N en la posición 21 (N(21)), N en la posición 122 (N(122)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1. Una sulfamidasa modificada que carece de restos de glicanos naturales en estos cinco sitios puede mejorar adicionalmente la farmacocinética de la enzima modificada, por ejemplo, ya que la depuración del plasma en un mamífero puede reducirse aún más. Como consecuencia, la frecuencia de dosificación de una sulfamidasa modificada también puede reducirse adicionalmente.

La sulfamidasa humana (EC 3.10.1.1; SEQ ID NO:1) está codificada por el gen SGSH. La sulfamidasa también se conoce por los nombres sulfamidasa, N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa, N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa, sulfamato sulfohidrolasa, heparán sulfato sulfatasa, heparin sulfamidasa, 2-desoxi-D-glucósido-2-sulfamato sulfohidrolasa, y N-sulfo-D-glucosamina sulfohidrolasa, y el término "sulfamidasa", como se usa en el presente documento, debe entenderse como equivalente a estos nombres alternativos.

En una realización, dicha sulfamidasa modificada está aislada.

En una realización, dicha sulfamidasa es sulfamidasa humana.

En una realización, dicha sulfamidasa antes de la modificación está glucosilada.

En una realización, dicha sulfamidasa modificada es recombinante. La sulfamidasa puede producirse de forma recombinante, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 en el presente documento. La sulfamidasa puede

producirse en células eucariotas, de forma ejemplar por, pero sin limitación, células de hámster de ovario chino (CHO), células de riñón embrionario humano o líneas de células linfoides de origen murino. Además, la sulfamidasa puede producirse en células de insectos, células vegetales o células de levadura. La sulfamidasa humana recombinante se conoce a partir de, por ejemplo, las patentes N.º US 5.863.782; US 5.972.333; US 6.200.563; US 6.458.579; y US 6.491.913. Debe entenderse que, para los fines de la presente invención, la sulfamidasa humana puede producirse como se describe en cualquiera de las patentes de Estados Unidos mencionadas.

En una realización, dicha sulfamidasa modificada comprende un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, o un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido como se define en la SEQ ID NO:1, en donde los restos de glicanos naturales están ausentes en al menos cuatro de los cinco sitios de N-glicosilación: N en la posición 21 (N(21)), N en la posición 122 (N(122)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1, y dicha sulfamidasa opcionalmente tiene un extremo C-terminal intacto. En una realización del mismo, la parte c-terminal representada por los aminoácidos 436-484 de SEQ ID NO:1 está intacta.

En un aspecto, se proporciona una composición de sulfamidasa que comprende sulfamidasa modificada no tiene sustancialmente epítomos para receptores de reconocimiento de glicano, en la que los restos de glicano naturales de dicha sulfamidasa se interrumpen mediante rupturas de enlace sencillo y rupturas de dobles enlaces, siendo la extensión de las rupturas de enlace sencillo por rupturas de enlace total de al menos el 60 % en oligomanosa glicanos, permitiendo de ese modo el transporte de dicha sulfamidasa a través de la barrera hematoencefálica de un mamífero, y que tiene una relación Ca-formilglicina (FGly) con respecto a serina (Ser) en el sitio activo que es mayor de 1, proporcionando de este modo actividad catalítica en el cerebro de dicho mamífero. Por ejemplo, dicha sulfamidasa modificada comprende un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, o un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos con un polipéptido como se define en la SEQ ID NO:1. En dichos ejemplos, la relación FGly con respecto a Ser se puede definir como una relación FGly50 con respecto a Ser50. Por lo tanto, la relación definida implica que FGly50 está presente en mayor medida que Ser50. Preferiblemente, la relación es mayor de 1,5, más preferiblemente mayor de 2,3, más preferiblemente mayor de 4, y más preferiblemente la relación es de aproximadamente 9. Una relación mayor indica que la actividad catalítica de la sulfamidasa modificada en mayor medida puede conservarse de una forma no modificada de sulfamidasa.

Las ventajas de una composición que comprende una sulfamidasa modificada son similares a las ventajas de una sulfamidasa modificada como tal. Por lo tanto, una composición que comprende sulfamidasa modificada puede presentar una semivida mejorada en plasma en comparación con una sulfamidasa no modificada o una composición que comprende sulfamidasa no modificada. Además, dicha sulfamidasa modificada puede mostrar una distribución mejorada en el cerebro de un mamífero, así como una actividad catalítica conservada en el cerebro, en comparación, por ejemplo, con una sulfamidasa no modificada.

En una realización, la composición de sulfamidasa tiene un contenido relativo de restos de glicano natural que es de aproximadamente el 25 % del contenido de restos de glicanos naturales en sulfamidasa recombinante no modificada. Dichos epítomos para receptores de reconocimiento de glicano pueden encontrarse, por lo tanto, en restos de glicanos naturales, y dichos restos de glicanos naturales están, por lo tanto, sustancialmente ausentes en la composición de sulfamidasa como se describe en el presente documento. Una composición de sulfamidasa modificada en la que el contenido relativo de restos de glicanos naturales de la composición como tal es de aproximadamente el 25 % puede representarse, por ejemplo, mediante una composición de sulfamidasa modificada en la que cada sulfamidasa comprende un glicano natural, por ejemplo, un resto de glicano natural en uno de los sitios de N-glicosilación mencionados anteriormente. El contenido relativo de epítomos de glicanos naturales en la composición de sulfamidasa puede ser, en realizaciones preferidas, inferior al 20 %, inferior al 15 %, inferior al 10 %, inferior al 5 %. En algunos casos, el contenido relativo de restos de glicanos naturales es inferior al 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, tal como inferior al 0,1 %, tal como inferior al 0,01 %. Una composición de sulfamidasa que tiene un contenido relativo de restos de glicanos naturales a estos niveles es una composición en la que solo se pueden encontrar cantidades mínimas de restos de glicanos naturales. Por lo tanto, la composición es una mezcla de sulfamidases modificadas en la que los restos de glicanos naturales están más o menos interrumpidos. En una realización particular, el contenido de restos de glicanos naturales es inferior al 1 %. Un contenido relativo de glicanos naturales a un nivel de aproximadamente o inferior al 25 % puede reducir ventajosamente la endocitosis mediada por receptores de sulfamidasa en las células a través de receptores de reconocimiento de glicanos, y mejorar el transporte a través de la barrera hematoencefálica.

En una realización particular del aspecto de la composición, dichos epítomos están ausentes al menos en cuatro de

los cinco sitios de N-glicosilación: asparagina (N) en la posición 21 (N(21)), N en la posición 122 (N(122)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1, preferiblemente dichos epítomos están ausentes en N(21), N(122), N(244) y N(393). Formulada de forma alternativa, dicha sulfamidasa modificada de la composición comprende restos de glicanos naturales en no más de uno de dichos sitios de N-glicosilación, siendo dicho sitio de N-glicosilación opcionalmente N(131).

En una realización del aspecto de la composición, no está presente más del 5 % (en peso) de dicha sulfamidasa modificada en formas multiméricas que tienen un peso molecular superior a 10^{10} kDa.

- 10 En una realización del aspecto de la composición, no está presente más del 5 % (en peso) de dicha sulfamidasa modificada en formas oligoméricas, teniendo dichas formas oligoméricas un peso molecular de entre 180 y 480 kDa. La presencia de formas oligoméricas, multiméricas o agregadas, puede determinarse, por ejemplo, mediante dispersión de luz dinámica o mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En este contexto, las formas agregadas deben entenderse como formas de proteínas de alto peso molecular compuestas por estructuras que varían desde monómeros nativamente plegados a desplegados. Las formas agregadas de una proteína pueden mejorar la respuesta inmune a la forma monomérica de la proteína. La explicación más probable para una respuesta inmune mejorada es que las presentaciones multivalentes del antígeno entrecruzan los receptores de linfocitos B e inducen de este modo una respuesta inmune. Este es un fenómeno que se ha utilizado en la producción de vacunas donde el antígeno se presenta al huésped en una forma agregada para asegurar una alta respuesta inmune.
- 15
- 20 Para las proteínas terapéuticas, el dogma es el opuesto; cualquier contenido de formas de alto peso molecular debe minimizarse o evitarse para minimizar la respuesta inmune (Rosenberg, AAPS J, 8:E501-7 (2006)). Por lo tanto, la reducción de formas oligoméricas, multiméricas y/o agregadas puede proporcionar de este modo una enzima más adecuada para uso en terapia.
- 25 Otro aspecto de la agregación es que la aparición de incluso una pequeña cantidad en una muestra puede inducir la agregación de proteínas normalmente plegadas. El material agregado generalmente tiene poca o ninguna actividad restante y mala solubilidad. La aparición de agregados puede ser uno de los factores que determinen la semivida de un medicamento biológico (Wang, Int J Pharm, 185:129-88 (1999)).
- 30 El término "composición" como se usa en el presente documento debe entenderse que incluye formas sólidas y líquidas. Una composición puede ser preferiblemente una composición farmacéutica, adecuada para la administración a un paciente (por ejemplo, un mamífero), por ejemplo, por inyección o por vía oral.

Además, debe entenderse que las realizaciones, y sus ventajas, descritas en relación con los aspectos de sulfamidasa modificada son realizaciones también del aspecto de la composición. De la misma manera, las realizaciones del aspecto de la composición también deberían considerarse como realizaciones de los aspectos de sulfamidasa modificada, cuando sea aplicable.

40 En una realización, dicha sulfamidasa modificada o dicha composición de sulfamidasa es para su uso en terapia.

En una realización, dicho cerebro de mamífero es el cerebro de un ser humano. En una realización relacionada, dicho mamífero es, por lo tanto, un ser humano.

45 En una realización, dicho cerebro de mamífero es el cerebro de un ratón. En una realización relacionada, dicho mamífero es, por lo tanto, un ratón.

En una realización, dicha sulfamidasa modificada o composición de sulfamidasa es para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad por depósito lisosomal, en particular mucopolisacaridosis IIIA (MPS IIIA).

50 En una realización, dicha sulfamidasa modificada o composición de sulfamidasa para su uso reduce el depósito de heparán sulfato en el cerebro de dicho mamífero. En particular, dicho depósito de heparán sulfato se reduce en al menos el 30 % en, por ejemplo, un modelo animal, tal como al menos el 35 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %.

55 En un caso, se proporciona una sulfamidasa modificada, en donde dicha sulfamidasa se ha preparado mediante reacción secuencial con un peryodato de metal alcalino y un borohidruro de metal alcalino, modificando de este modo los epítomos para receptores de reconocimiento de glicano de la sulfamidasa y reduciendo la actividad del sulfamidasa con respecto a dichos receptores de reconocimiento de glicanos, conservando al mismo tiempo la actividad catalítica de dicha sulfamidasa. Por lo tanto, la sulfamidasa se modifica porque sus epítomos, o restos de glicano, presentes en su forma natural, glucosilada antes de la modificación, se han inactivado esencialmente

- mediante dicha modificación. La presencia de epítomos para los receptores de reconocimiento de glicanos se ha reducido de este modo en la sulfamidasa modificada. Debe entenderse que las realizaciones, y sus ventajas, descritas en relación con los demás aspectos descritos en el presente documento, tales como los aspectos relacionados con la sulfamidasa modificada, la composición y el método de preparación, son realizaciones también de este aspecto. En particular, las diversas realizaciones de métodos descritas a continuación proporcionan una definición ejemplar adicional de la preparación de dicha sulfamidasa modificada en términos de condiciones de reacción específicas. De forma similar, las realizaciones descritas en relación con la sulfamidasa modificada y los aspectos de la composición anteriores proporcionan una definición ejemplar adicional de la sulfamidasa modificada.
- 10 En un aspecto, se proporciona un método para preparar una sulfamidasa modificada, comprendiendo dicho método: a) hacer reaccionar una sulfamidasa glucosilada con un peryodato de metal alcalino durante un periodo de tiempo no superior a 4 h, y b) hacer reaccionar dicha sulfamidasa con un borohidruro de metal alcalino durante un periodo de tiempo no superior a 2 h; modificando de este modo restos de glicano de la sulfamidasa y reduciendo la actividad de la sulfamidasa con respecto a los receptores de reconocimiento de glicano, mientras se conserva la actividad catalítica de dicha sulfamidasa, en donde dicha sulfamidasa modificada muestra actividad catalítica en el cerebro de dicho mamífero. Dicho borohidruro se usa opcionalmente a una concentración de entre 10 y 80 mM.

- Por lo tanto, el método anterior proporciona una modificación química suave de la sulfamidasa que reduce la presencia de epítomos para los receptores de reconocimiento de glicanos, estando dichos epítomos, por ejemplo, representados por restos de glicanos naturales como se describe en el presente documento. Esto ventajosamente puede proporcionar una sulfamidasa modificada adecuada para dirigirse al cerebro de un mamífero. El método suave además modifica dichos epítomos sin alterar sustancialmente la actividad catalítica de la sulfamidasa. En particular, la actividad catalítica puede conservarse conservando FGly50 en el sitio activo de sulfamidasa. Por lo tanto, al tiempo que mejora las propiedades de distribución de la enzima, el método no elimina la actividad catalítica.
- 20 Las ventajas adicionales con la sulfamidasa modificada preparada mediante el método suave se explican anteriormente, por ejemplo, para la sulfamidasa y los aspectos de la composición.

- El método permite la modificación de glicanos mediante la escisión de enlaces de carbono con peryodato entre dos grupos hidroxilo adyacentes de los restos de glicano (carbohidrato). En general, la escisión oxidativa con peryodato se produce cuando hay dioles vecinales presentes. Los dioles deben estar presentes en una posición ecuatorial - ecuatorial o axial - ecuatorial. Si los dioles están presentes en una posición axial-axial rígida, no tiene lugar ninguna reacción (Kristiansen et al, Car. Res (2010)). El tratamiento con peryodato romperá el enlace entre C2 y C3 y/o C3 y C4 del resto M6P, produciendo de este modo una estructura que es incapaz de unirse a un receptor M6P. En general, otras hexosas terminales también se procesarán de manera similar. Los residuos unidos a 1-4 no terminales se escinden solamente entre C2 y C3, mientras que los residuos unidos a (1-3) no terminales son resistentes a la escisión. En la Figura 7, los puntos de una posible modificación están marcados con un asterisco en los tres tipos generales de N-glicanos; oligomanosa, compleja e híbrida. Como se demuestra adicionalmente en las Figuras 8 a 10 adjuntas, el método como se describe en el presente documento proporciona una sulfamidasa modificada en la que los restos de glicanos naturales se han interrumpido por un número limitado de rupturas de enlace en comparación con sulfamidasa modificada de acuerdo con métodos previamente conocidos. El método descrito actualmente da como resultado predominantemente un único tipo de ruptura de enlace en restos de azúcar de los restos de glicano de sulfamidasa (véase la Figura 8). La oxidación parcial de glicano con rupturas preferiblemente de enlace sencillo en restos de azúcar de los restos de glicano es una característica de los métodos de modificación química relativamente suaves descritos en el presente documento. Con el fin de conseguir sulfamidasa con oxidación parcial de glicano y rupturas de enlace predominantemente sencillo en restos de azúcar de los restos de glicano, se pueden usar las condiciones que se describen a continuación y que se ilustran en el Ejemplo 4.

- El método para preparar una sulfamidasa modificada, y la sulfamidasa modificada como se describe en el presente documento, se mejoran con respecto a los métodos y compuestos de la técnica anterior. Principalmente, los inventores han descubierto sorprendentemente que la nueva sulfamidasa modificada se distribuye y desempeña actividad catalítica en el cerebro de mamífero. Los Ejemplos 3 y 5 proporcionan además comparaciones entre los métodos de la técnica anterior y sulfamidasas y los métodos y sulfamidasas que se describen en el presente documento. Los resultados en estos ejemplos muestran que la sulfamidasa modificada de acuerdo con métodos conocidos contiene modificaciones de residuos de aminoácidos, y muestra divisiones de la cadena polipeptídica y agregación de proteínas. De particular interés es la conversión observada del residuo FGly catalítico en un residuo Ser en el sitio activo en la sulfamidasa modificada de acuerdo con el método anterior. La duración relativamente corta de la etapa de reducción en el nuevo método parece influir positivamente en la actividad catalítica de la enzima modificada.

En una realización del aspecto del método, dicho polipéptido de sulfamidasa glucosilada comprende restos de glicano en al menos cuatro restos de asparagina (sitios de N glucosilación).

5 En una realización del aspecto del método, dichos residuos de asparaginas glucosiladas son: N en la posición 21 (N(21)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1. Por lo tanto, estos sitios de N-glucosilación corresponden a restos de glicanos naturales.

10 En una realización del aspecto del método, dicho peryodato de metal alcalino oxida grupos *cis*-glicol de los restos de glicano en grupos aldehído.

En una realización del aspecto del método, dicho borohidruro de metal alcalino reduce dichos aldehídos en alcoholes.

15 En una realización del aspecto del método, la etapa a) y la etapa b) se realizan en secuencia sin realizar una etapa intermedio. Los inventores han descubierto que la etapa b) se puede realizar inmediatamente después de la etapa a), o después de una etapa de inactivación opcional a2) como se describe a continuación, omitiendo de este modo una etapa intermedia para la eliminación de reactivos por ejemplo, por diálisis, ultrafiltración, precipitación o cambio de tampón y evitando de este modo la exposición prolongada de sulfamidasa a los intermedios aldehídos reactivos. Continuyendo con la etapa b) después de la etapa a), u opcionalmente a2), la duración global de la reacción también se reduce ventajosamente.

20 En los siguientes párrafos, se describen realizaciones específicas para la etapa a). Debería entenderse que, a menos que se defina de otro modo, pueden combinarse realizaciones específicas de aspectos descritos en el presente documento.

25 En una realización, dicho peryodato de metal alcalino es *meta*-peryodato de sodio.

30 En una realización, dicha reacción de la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 4 h, tal como no más de 3 h, tal como no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h. En ciertas realizaciones, la reacción de la etapa a) se realiza durante al menos 0,5 h. La reacción tiene preferiblemente una duración de aproximadamente 3 h, 2 h, 1 h, o menos de 1 h. Los inventores han encontrado que una duración de la etapa a) de no más de 4 horas inactiva eficientemente los epítopos para los receptores de reconocimiento de glicano. Además, una duración de no más de 4 h todavía da lugar a un menor grado de rupturas de cadena de la cadena polipeptídica en comparación con el grado de rupturas de cadena observado para la sulfamidasa producida de acuerdo con métodos conocidos. Esto ha sido demostrado por los inventores, por ejemplo, en el Ejemplo 4 y 5.

40 En una realización, dicho peryodato se usa a una concentración (final) de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM. El peryodato puede usarse a una concentración de 8-20 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM. Como alternativa, el peryodato se usa a una concentración de menos de 20 mM, tal como entre 10 y 19 mM. Se ha encontrado que una menor concentración de peryodato de metal alcalino, tal como *meta*-peryodato de sodio, reduce el grado de rupturas de cadena de la cadena polipeptídica, así como la oxidación asociada en cadenas laterales de aminoácidos, tal como la oxidación del residuo de metionina en la posición 226 de la SEQ ID NO:1 (Met226).

45 En una realización, dicha reacción de la etapa a) se realiza a temperatura ambiente, y preferiblemente a una temperatura de entre 0 y 22 °C. En una realización preferida, la reacción de dicha etapa a) se realiza a una temperatura de 0-8 °C, tal como a una temperatura de 0-4 °C. En una realización preferida, la reacción de la etapa a) se realiza a una temperatura de aproximadamente 8 °C, a una temperatura de aproximadamente 4 °C o a una temperatura de aproximadamente 0 °C.

50 En una realización, dicha reacción de la etapa a) se realiza a un pH de 3 a 7. Este pH debe entenderse como el pH al inicio de la reacción. En realizaciones particulares, el pH usado en la etapa a) es 3-6, tal como 4-5. En realizaciones específicas, el pH utilizado en la etapa a) es de aproximadamente 6, aproximadamente 5 o aproximadamente 4. Al disminuir el pH de la etapa a), la concentración de peryodato o el tiempo de reacción de la etapa a) puede reducirse.

55 En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio y se usa a una concentración (final) de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM. En una realización, dicho *meta*-peryodato de sodio se usa a una concentración de 8-20 mM. En realizaciones preferidas, se usa *meta*-peryodato de sodio a

una concentración de aproximadamente 10 mM.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio y se usa a una concentración (final) de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM, y dicha reacción de la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 4 h, tal como no más de 3 h, tal como no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h. Por lo tanto, en comparación con los métodos de la técnica anterior, una concentración de peryodato 20 mM y una duración de reacción de no más de 4 h pueden dar como resultado menos ruptura de cadena y oxidación. Disminuir adicionalmente la concentración de peryodato mientras se mantiene la duración de reacción relativamente corta afecta positivamente a la ruptura de cadena y a la oxidación adicionalmente. Una concentración de menos de 20 mM da como resultado incluso menos ruptura de cadena y oxidación, y una concentración de no más de 15 mM da como resultado incluso menos ruptura de cadena y oxidación, y una concentración de aproximadamente 10 mM da como resultado el menor grado de ruptura de cadena y oxidación. Como se demuestra en el Ejemplo 5, la sulfamidasa modificada de acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento muestra menos ruptura de cadena, especialmente en la parte c-terminal de la sulfamidasa, como se representa, por ejemplo, por los aminoácidos 436-484 de la SEQ ID NO:1. Se ha encontrado que esta parte c-terminal está intacta en la sulfamidasa preparada como se describe en el presente documento. Además, la oxidación de metionina en la posición 226 (Met226) es menos frecuente.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio y se usa a una concentración (final) de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM, y dicha reacción de la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 4 h, tal como no más de 3 h, tal como no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h a una temperatura de entre 0 y 22 °C, tal como aproximadamente 8 °C, tal como aproximadamente 0 °C.

En una realización, dicho peryodato se usa a una concentración de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM, y dicha reacción de la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 4 h, tal como no más de 3 h, tal como no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h, a una temperatura de entre 0 y 22 °C, tal como una temperatura de 0-8 °C, tal como una temperatura de 0-4 °C, tal como aproximadamente 8 °C, tal como aproximadamente 0 °C.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio y dicha reacción de la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 4 h, tal como no más de 3 h, tal como no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h a una temperatura de entre 0 y 22 °C, tal como una temperatura de 0-8 °C, tal como una temperatura de 0-4 °C, tal como aproximadamente 8 °C, tal como aproximadamente 0 °C.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio que se usa a una concentración de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM, y dicha reacción de la etapa a) se realiza a una temperatura de entre 0 y 22 °C, tal como una temperatura de 0-8 °C, tal como una temperatura de 0-4 °C, tal como aproximadamente 8 °C, tal como aproximadamente 0 °C.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio que se usa a una concentración de aproximadamente 10 mM, y dicha reacción de la etapa a) se realiza a una temperatura de aproximadamente 8 °C y durante un periodo de tiempo de no más de 2 h.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio que se usa a una concentración de aproximadamente 10 mM, y dicha reacción de la etapa a) se realiza a una temperatura de 0-8 °C y durante un periodo de tiempo de no más de 3 h.

En los siguientes párrafos, se describen realizaciones específicas de la etapa b). Se debe entender que, a menos que se defina otra cosa, pueden combinarse realizaciones específicas, en particular realizaciones específicas de la etapa a) y la etapa b).

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio.

En algunos casos, se ha encontrado que las condiciones usadas para la etapa b) dependen parcialmente de las condiciones usadas para la etapa a). Aunque la cantidad de borohidruro usada en la etapa b) preferiblemente se mantiene lo más baja posible, la relación molar de borohidruro con respecto a peryodato es en tales casos de 0,5-4 a 1. Por lo tanto, el borohidruro puede usarse en la etapa b) en un exceso molar de 4 veces la cantidad de peryodato usada en la etapa a). En una realización, dicho borohidruro se usa a una concentración molar (final) de no más de 4

times la concentración (final) de dicho peryodato. Por ejemplo, puede usarse borohidruro a una concentración de no más de 3 veces la concentración de dicho peryodato, tal como no más de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato, tal como no más de 2 veces la concentración de dicho peryodato, tal como no más de 1,5 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración correspondiente aproximadamente a la

5 concentración de dicho peryodato. Si embargo, en realizaciones particulares, se usa borohidruro a una concentración correspondiente a la mitad de la concentración de peryodato, o 0,5 veces la concentración de peryodato. Por lo tanto, cuando se usa peryodato a una concentración de aproximadamente 20 mM, puede usarse borohidruro a una concentración de no más de 80 mM, o incluso a una concentración entre 10 y 80 mM, tal como a una concentración de entre 10 y 50 mM. Si se usa peryodato a una concentración de entre 10 y 20 mM, puede

10 usarse borohidruro a una concentración de entre 25 y 80 mM, tal como, por ejemplo, 50 mM. De forma similar, si se usa peryodato a una concentración de aproximadamente 10 mM, puede usarse borohidruro a una concentración de no más de 40 mM, tal como, por ejemplo, no más de 25 mM. Además, en tal realización, puede usarse preferiblemente borohidruro a una concentración de entre 12 mM y 50 mM. Los inventores han descubierto que la concentración de borohidruro influye en el grado de conservación de un residuo de aminoácido catalítico en el sitio

15 activo de sulfamidasa, y por lo tanto, que una concentración relativamente inferior de borohidruro puede proporcionar una sulfamidasa modificada que tiene actividad catalítica conservada.

En una realización, dicha reacción de la etapa b) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 1,5 h, tal como no más de 1 h, tal como no más de 0,75 h, tal como aproximadamente 0,5 h. La duración de la reacción es

20 preferiblemente aproximadamente 1 h, o menos de 1 h. En algunos casos, la reacción de la etapa b) tiene una duración de aproximadamente 0,25 h. En realizaciones adicionales, la reacción de la etapa b) puede realizarse durante un periodo de tiempo de 0,25 h a 2 h. Como se ha explicado anteriormente, se ha encontrado que la duración de la etapa de reducción afecta a la actividad catalítica de la sulfamidasa. Una duración de reacción relativamente corta puede proporcionar una sulfamidasa modificada que comprende FGly50 en lugar de Ser50.

25 Además, se ha encontrado que una duración de reacción más corta influye favorablemente en la integridad estructural global de la enzima. En particular, la agregación de proteínas que da como resultado formas de sulfamidasa de alto peso molecular, así como la aparición de ruptura de cadena parecen estar al menos parcialmente relacionadas con el tiempo de reacción. Por lo tanto, una duración de reacción relativamente corta para la etapa b) puede reducir la aparición de agregados, así como rupturas de cadena. Como se explica en otra parte de

30 este texto, la presencia reducida de formas agregadas puede hacer que una proteína sea más adecuada para su uso en terapia.

En una realización, dicha reacción de la etapa b) se realiza a una temperatura de entre 0 y 8 °C. Se ha encontrado que la temperatura de reacción para la etapa b) afecta, al menos parcialmente, a la actividad catalítica del producto

35 de reacción. En particular, la conversión de un residuo catalítico en el sitio activo de sulfamidasa está relacionada con la temperatura de reacción. Por lo tanto, puede ser ventajoso realizar la etapa b) a una temperatura inferior a 8 °C. La temperatura es preferiblemente de aproximadamente 0 °C.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio que se usa a una concentración de

40 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración de no más de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio que se usa a una concentración de 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración de no más de 2,5 veces la

45 concentración de dicho peryodato, y dicha reacción de la etapa b) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio que se usa a una concentración de 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración de no más de 2,5 veces la

50 concentración de dicho peryodato, y dicha reacción de la etapa b) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h, a una temperatura de entre 0 y 8 °C.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino se usa a una concentración de 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración de no más de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato, y

55 dicha reacción de la etapa b) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h, a una temperatura de entre 0 y 8 °C.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio, y dicha reacción de la etapa b) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 1 h, tal como aproximadamente 0,5 h, a una temperatura de

entre 0 y 8 °C.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio que se usa a una concentración de 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración de no más de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato, y dicha reacción de la etapa b) se realiza a una temperatura de entre 0 y 8 °C.

En una realización, dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio que se usa a una concentración de 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como a una concentración de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato, y dicha reacción de la etapa b) se realiza a una temperatura de aproximadamente 0 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 0,5 h.

En una realización, dicho peryodato es *meta*-peryodato de sodio y dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio.

15 En una realización, cada una de la etapa a) y al etapa b) se realiza individualmente durante un periodo de tiempo de no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como aproximadamente 1 h o aproximadamente 0,5 h. Opcionalmente, dicho borohidruro se usa a una concentración de 0,5-4 veces la concentración de dicho peryodato, preferiblemente 0,5-2,5 veces la concentración de dicho peryodato. En ciertas realizaciones, dicho borohidruro se usa a una concentración de 0,5 veces la concentración del peryodato, o a una concentración de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato.

En una realización, la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 3 h y la etapa b) se realiza durante no más de 1 h. Opcionalmente, dicho borohidruro se usa a una concentración de no más de 4 veces la concentración de dicho peryodato, preferiblemente no más de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato.

25 El experto en la técnica conoce formas de controlar la duración de la reacción de una reacción química, tal como la duración de la reacción de cada una de las etapas a) y b). Por lo tanto, en una realización, dicho aspecto del método comprende adicionalmente a2) la interrupción de la reacción resultante de la etapa a). Dicha interrupción, por ejemplo, tiene una duración de menos de 30 minutos, tal como menos de 15 minutos. En algunos casos, dicha interrupción se realiza inmediatamente después de la etapa a). La interrupción puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de etilenglicol. Se puede añadir etilenglicol a una concentración final de 192 mM. Preferiblemente, la etapa b) va inmediatamente después de la interrupción rápida. Esto puede minimizar el periodo de exposición de la sulfamidasa a grupos aldehídos reactivos. Los aldehídos reactivos pueden promover la inactivación y la agregación de la proteína.

35 En una realización, dicho método comprende adicionalmente b2) la interrupción de la reacción resultante de la etapa b). Esta interrupción puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de una molécula que contiene un grupo de cetona o aldehído, tal como ciclohexanona o acetona, siendo dicha molécula preferiblemente soluble en agua. Como alternativa, dicha interrupción puede realizarse disminuyendo el pH por debajo de 6 de la mezcla de reacción mediante la adición de ácido acético u otro ácido. En algunos casos, dicha interrupción se realiza mediante la adición de acetona hasta una concentración final de aproximadamente 0,1 M. Una etapa de interrupción opcional permite un control preciso de la duración de la reacción para la etapa b). Controlar la duración de la reacción de esta manera puede proporcionar además la reproducibilidad del proceso en términos de contenido de FGly50.

45 Por lo tanto, el método como se describe en el presente documento proporciona una sulfamidasa modificada que tiene una serie de ventajas sobre la sulfamidasa modificada de acuerdo con la técnica anterior. Por lo tanto, los inventores han encontrado condiciones para la modificación química de sulfamidasa con un impacto negativo mínimo sobre la integridad estructural de la cadena polipeptídica de sulfamidasa, dando como resultado simultáneamente una ausencia sustancial de estructuras de glicano natural, lo que sugiere una modificación casi completa de glicanos en los cuatro sitios naturales glucosilados conservando al mismo tiempo la actividad catalítica. Sorprendentemente, en un ejemplo particular, se encontró que las condiciones usadas para la etapa a) facilitaban las condiciones para realizar la etapa b). Las realizaciones ejemplares del método se representan en la Figura 1B, 1C y 1D.

55 En un aspecto, se proporciona una sulfamidasa modificada que puede obtenerse mediante el método de acuerdo con el aspecto del método definido anteriormente.

En un aspecto, se proporciona una sulfamidasa modificada que puede obtenerse por el aspecto del método como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia.

En un aspecto, se proporciona una sulfamidasa modificada que puede obtenerse por el aspecto del método como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal, en particular mucopolisacaridosis IIIA (MPS IIIA).

5

En un caso, se proporciona el uso de una sulfamidasa modificada en la fabricación de un medicamento, para cruzar la barrera hematoencefálica para tratar una enfermedad por depósito lisosomal, tal como mucopolisacaridosis IIIA (MPS IIIA), en un cerebro de mamífero, dicha modificación comprende tener restos de glicano modificados químicamente por tratamiento secuencial de la enzima con un peryodato de metal alcalino y un borohidruro de metal alcalino, reduciendo de este modo la actividad de la sulfamidasa con respecto a receptores de reconocimiento de glicano, tales como sistemas de administración celular de manosa y manosa-6-fosfato, conservando al mismo tiempo la actividad catalítica de dicha sulfamidasa.

10

En un caso, se proporciona un método para tratar a un mamífero que padece una enfermedad por depósito lisosomal, tal como mucopolisacaridosis IIIA (MPS IIIA), que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una sulfamidasa modificada, seleccionándose dicha sulfamidasa modificada de:

15

a) una sulfamidasa modificada como se describe en los aspectos y realizaciones en el presente documento;

20

b) una composición de sulfamidasa como se describe en los aspectos y realizaciones en el presente documento, y

c) una sulfamidasa modificada en la que la modificación comprende tratamiento secuencial de dicha sulfamidasa modificada con un peryodato de metal alcalino y un borohidruro de metal alcalino, por lo que la sulfamidasa tiene sus restos de glicano modificados químicamente para reducir su actividad con respecto a receptores de reconocimiento de glicano, tales como sistemas de administración celular de manosa y manosa 6-fosfato, conservando al mismo tiempo la actividad enzimática catalítica.

25

En una realización del mismo, dicho tratamiento da como resultado la depuración de aproximadamente al menos el 48 % del depósito lisosomal del cerebro de un mamífero después de la administración de 10 dosis de sulfamidasa modificada durante un periodo de tiempo de 70 días. Además, dicho tratamiento da como resultado la depuración de aproximadamente al menos el 30 % del depósito lisosomal del cerebro de un mamífero después de la administración de 13 dosis de sulfamidasa modificada durante un periodo de tiempo de 25 días.

30

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una imagen que describe las diferencias entre los métodos para la modificación química desarrollados por los inventores, descritos en el Ejemplo 4, y el método conocido, descrito en el documento WO 2008/109677.

40

La Figura 2A muestra un gel SDS-PAGE de sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido. Se identificaron cuatro bandas de proteína, representadas 1-4, generadas por el procedimiento de modificación de glicanos.

La Figura 2B muestra un gel SDS-PAGE tanto de sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido como también de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 como se describe en el presente documento.

45

La Figura 3A muestra un cromatograma SEC de sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido.

La Figura 3B muestra un cromatograma SEC de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 como se describe en el presente documento. Se marca por una flecha la cantidad de formas multiméricas de sulfamidasa modificada.

50

La Figura 4A muestra la intensidad de dispersión medida mediante dispersión de luz dinámica de sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido.

La Figura 4B muestra la intensidad de dispersión medida mediante dispersión de luz dinámica de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 como se describe en el presente documento.

55

La Figura 5 es un diagrama que visualiza la endocitosis mediada por receptores en células MEF-1 de sulfamidasa recombinante no modificada, sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido, y sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 y 2 como se describe en el presente documento.

La Figura 6A muestra los resultados del tratamiento *in vivo* de ratones deficientes en MPS IIIA. El diagrama muestra la depuración del depósito de heparán sulfato en el cerebro de ratones después de una

dosificación i.v. cada dos días (13 dosis) de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 a 30 mg/kg.

La Figura 6B muestra los resultados del tratamiento *in vivo* de ratones deficientes en MPS IIIA. El diagrama muestra la depuración del depósito de heparán sulfato en el hígado de ratones después de una dosificación i.v. cada dos días (13 dosis) de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 a 30 mg/kg.

La Figura 6C muestra los resultados del tratamiento *in vivo* de ratones deficientes en MPS IIIA. El diagrama muestra la depuración del depósito de heparán sulfato en el cerebro de ratones después de la dosificación i.v. una vez a la semana (10 dosis) de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 a 30 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente.

La Figura 7 es un dibujo esquemático de las tres estructuras arquetípicas de N-glicanos generalmente presentes en las proteínas. El glicano de la izquierda representa el tipo oligomanosa, el central el tipo complejo y el derecho el tipo híbrido. En la figura, se representan los siguientes compuestos: los rombos de color negro corresponden al ácido N-acetilneuramínico; los círculos de color negro corresponden a manosa; los cuadrados corresponden a N-acetilglucosamina; el triángulo de color negro corresponde a fucosa; el círculo corresponde a galactosa. Los restos de azúcar marcados con un asterisco se pueden modificar mediante el tratamiento de peryodato/borohidruro descrito en el presente documento.

La Figura 8A es un dibujo esquemático que ilustra las rupturas de enlace previstas en la manosa después de la modificación química.

La Figura 8B es un dibujo esquemático que ilustra un modelo de un Man-6 glicano. Se indican los restos de azúcar susceptibles de rupturas de enlace tras la oxidación con peryodato. Los círculos de color gris corresponden a manosa, los cuadrados de color negro corresponden a N-acetilglucosamina, T13 corresponde al péptido tríptico NITR con el sitio N-glucosilación N(131) incluido.

La Figura 9 representa los espectros de masas de los iones doblemente cargados correspondientes al péptido tríptico T13 con el Man-6 glicano unido a N(131) (T13 + Man-6 glicano), antes de (A) y después de la modificación química (B-D) de acuerdo con un método conocido previamente (S. = rupturas de enlace sencillo, D. = rupturas de doble enlace, por ejemplo, D.x3 = 3 rupturas de doble enlace).

La Figura 10A es un diagrama que visualiza el grado de ruptura de enlace del péptido tríptico T13+Man-6 glicano después de la modificación química de acuerdo con el método previamente conocido (barra de color negro), nuevo método 1 (puntos de color negro), nuevo método 3 (blanco), y nuevo método 4 (a cuadros entrecruzados).

La Figura 10B es un diagrama que visualiza la abundancia relativa de rupturas de enlace sencillo en el péptido tríptico T13+Man-6 glicano después de la modificación química de acuerdo con el método previamente conocido (barra de color negro), nuevo método 1 (puntos de color negro), nuevo método 3 (blanco), y nuevo método 4 (a cuadros entrecruzados).

La Figura 11 es una tabla que enumera las secuencias de aminoácidos de la sulfamidasa humana, en la que la SEQ ID NO:1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de la sulfamidasa humana, la SEQ ID NO:2 corresponde a GS-sulfamidasa, y la SEQ ID NO:3 corresponde a sulfamidasa GS.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación describen el desarrollo de un polipéptido de sulfamidasa modificada de acuerdo con la presente descripción.

Ejemplo 1:

Cultivo, purificación y caracterización de sulfamidasa

Material y métodos

50 **Construcción de vectores de expresión para sulfamidasa:** Los genes sintéticos que codificaban sulfamidasa humana se sintetizaron por Geneart (Life Technologies), ambos en versiones optimizadas de codones para *H. sapiens* o *C. griseus* (células CHO) y la secuencia humana original. Los genes sintéticos se clonaron en diferentes vectores de expresión de mamíferos, tales como pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) o pQMCF1 (Icosagen).

55 **Producción de sulfamidasa:** Se evaluaron dos sistemas de expresión transitorios para determinar la producción de sulfamidasa, la expresión transitoria en células HEK293 usando vectores pcDNA3.1 (+) y el sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) usando el vector pQMCF1. En ambos sistemas, las células se cultivaron en medio estándar y la proteína secretada se recogió típicamente 6-8 días después de la transfección. Además, se evaluó una línea celular estable establecida usando un sistema de expresión de CHO

comercialmente disponible para la producción de sulfamidasa.

Se capturó la sulfamidasa del medio mediante cromatografía de intercambio aniónico (AIEX) en una columna de Q sepharose (GE Healthcare) equilibrada con Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 y se eluyó mediante un gradiente de NaCl. La sulfamidasa capturada se purificó adicionalmente mediante cromatografía con 4-mercapto-etilpiridina (MEP); las fracciones que contenían sulfamidasa se cargaron en una columna de cromatografía MEP HyperCel y posteriormente se eluyeron mediante elución isocrática en NaAc 50 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 4,6. El pulido final se logró mediante cromatografía de intercambio catiónico (CIEX) en una columna SP Sepharose FF (GE Healthcare) equilibrada en NaAc 25 mM, DTT 2 mM, pH 4,5. Se usó un gradiente de NaCl para la elución. La pureza y la identidad de los lotes de sulfamidasa de los diferentes sistemas de expresión se analizaron mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF-MS, datos no mostrados.

Análisis de glucosilación: El patrón de glucosilación se determinó para los diferentes lotes de sulfamidasa producidos. Antes del análisis con glucopéptidos, la sulfamidasa (aproximadamente 10 µg) se redujo, se alquiló y se digirió con tripsina. La reducción de la proteína se realizó mediante incubación en 5 µl de DTT 10 mM en NH₄HCO₃ 50 mM a 70 °C durante 1 h. La alquilación posterior con 5 µl de yodoacetamida 55 mM en NH₄HCO₃ 50 mM se realizó a temperatura ambiente (TA) y en la oscuridad durante 45 minutos. Por último, la digestión triptica se realizó mediante la adición de 30 µl de NH₄HCO₃ 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 8 y 0,2 µg/µl de tripsina en ácido acético 50 mM (relación proteasa:proteína 1:20 (p/p)). Se permitió que la digestión tuviera lugar durante una noche a 37 °C.

Cinco fragmentos peptídicos de la sulfamidasa digerida con tripsina contenían sitios potenciales de N-glucosilación. Estos fragmentos peptídicos que contenían posibles sitios de glucosilación N(x), donde x se refiere a la posición de la asparagina en la secuencia de aminoácidos de sulfamidasa como se define en la SEQ ID NO:1, fueron:

- Fragmento que contenía N(21) (residuo 4-35 de la SEQ ID NO:1, 3269,63 Da)
- Fragmento que contenía N(122) (residuo 105-130 de la SEQ ID NO:1, 2910,38 Da)
- Fragmento que contenía N(131) (residuo 131-134 de la SEQ ID NO:1, 502,29 Da)
- Fragmento que contenía N(244) (residuo 239-262 de la SEQ ID NO:1, 2504,25 Da)
- Fragmento que contenía N(393) (residuo 374-394 de la SEQ ID NO:1), 2542,22 Da

La asparagina de cada sitio de glucosilación potencial se indica en negrita y se da la masa molecular de cada fragmento peptídico.

Se investigaron las variantes de glucosilación posibles de los cinco fragmentos peptídicos tripticos por análisis de glucopéptidos. Esto se realizó mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS) en un sistema Agilent 1200 HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Agilent 6510 cuadrupolo (Q-TOF-MS). Ambos sistemas se controlaron por una MassHunter Workstation. La separación por LC se realizó mediante el uso de una columna Waters XSELECT CSH 130 C18 (150 x 2,1 mm), la temperatura de la columna se ajustó a 40 °C. La fase A móvil consistió en acetonitrilo al 5 %, ácido propiónico al 0,1 % y TFA al 0,02 %, y la fase móvil B consistió en acetonitrilo al 95 %, ácido propiónico al 0,1 % y TFA al 0,02 %. Se utilizó un gradiente del 0 % al 10 % de B durante 10 minutos, luego del 10 % al 70 % de B durante 25 minutos más a un caudal de 0,2 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl. El Q-TOF se operó en modo de ión de electronebulización positiva. Durante el transcurso de la adquisición de datos, la tensión del fragmentador, la tensión del skimmer y la RF octopolar se ajustaron a 90, 65 y 650 V, respectivamente. El intervalo de masa estaba entre 300 y 2800 m/z.

Resultados

La expresión transitoria en células HEK293 dio como resultado bajos niveles de sulfamidasa secretada (menos de 0,3 mg/l de medio, SEQ ID NO:3). El sistema de expresión episomal estable QMCF (Icosagen AS), dio como resultado la producción de sulfamidasa (SEQ ID NO:2) en títulos superiores a 10 mg/l en células CHO. La línea celular estable establecida a partir de un sistema de expresión de CHO dio como resultado títulos de sulfamidasa (SEQ ID NO:1) superiores a 40 mg/l.

La sulfamidasa se purificó hasta homogeneidad aparente con una masa molecular en el intervalo de 61-63 kDa. Basándose en la masa teórica de la cadena peptídica de 55 kDa, esto indica la presencia de glicanos con una masa molecular total de 6-8 kDa. La pureza y la identidad de los lotes de sulfamidasa se analizaron mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF-MS (resultados no mostrados).

El análisis de glucosilación para los péptidos digeridos con tripsina se realizó mediante LC-MS. Se realizó la

búsqueda manual de 30 tipos diferentes de glucosilación en cada glucopéptido. La cuantificación relativa se realizó midiendo las áreas pico de los cromatogramas de iones reconstruidos (sin corrección por la eficacia de la ionización). Cuatro de los cinco sitios putativos de N-glucosilación (N(21), N(131), N(244) y N(393)) se glucosilaron consistentemente a través de todos los lotes de sulfamidasa. N(21) y N(393) se ocuparon predominantemente por glicanos complejos, con un bajo grado de sialilación total. N(131) se ocuparon completamente por el tipo oligomanosa de glicanos. El grado de fosforilación de glicanos fue aproximadamente del 50 % para todos los lotes. El sitio N(131) era resistente a la desfosforilación por fosfatasa alcalina. El cuarto sitio, N(244), que difería en composición entre células CHO (SEQ ID NO:2) y células HEK293 (SEQ ID NO:3), produjo sulfamidasa estando la oligomanosa en lotes de CHO y una mezcla de oligomanosa/complejo en lotes de HEK293. El péptido triptico que contenía N(122) se encontró sin ningún glicano unido.

Ejemplo 2:

Modificación química de sulfamidasa de acuerdo con el método conocido previamente

15

Material y métodos

Modificación química de acuerdo con el método conocido (como se describe en

20 el documento WO 2008/109677): Para modificar los restos de glicano de sulfamidasa, la sulfamidasa (SEQ ID NO:2), producida como se describe en el Ejemplo 1 en el sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS), se incubó inicialmente con *meta*-periyodato de sodio 20 mM a 0 °C durante 6,5 h en fosfato sódico 20 mM, NaCl 100 mM (pH 6,0). La oxidación de glicanos se inactivó mediante la adición de etilenglicol a una concentración final de 192 mM. Se permitió que la inactivación continuara durante 15 min a 0 °C antes de realizar la diálisis frente a fosfato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM (pH 6,0) durante la noche a 4 °C. Después de la diálisis, se realizó la reducción mediante la adición de borohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 100 mM. La reacción de reducción se dejó transcurrir durante una noche. Finalmente, la preparación enzimática se dializó frente a fosfato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM (pH 7,5). Todas las incubaciones se realizaron en la oscuridad.

30

Resultados

Se produjo sulfamidasa modificada por triplicado de acuerdo con la secuencia de etapas representada en la Figura 1A.

35

Ejemplo 3:

Análisis de sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido

40 *Material y métodos*

La sulfamidasa modificada de acuerdo con el Ejemplo 2, correspondiente al método conocido, se sometió a los siguientes análisis.

45 *Análisis SDS-PAGE:* Se cargaron 5 µg de sulfamidasa modificada en cada pocillo en un gel de Bis-Tris NuPAGE al 4-12 %. Se usó el marcador Seeblye 2 plus y el gel se coloreó con Instant Blue (C.B.S Scientific).

Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): La enzima modificada se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño analítico, realizada en un sistema ÄKTAmicro (GE Healthcare). Se usó una columna Superdex 50 200 PC 3.2/30 con un caudal de 40 µl/min de tampón de formulación. El volumen de muestra era de 10 µl y contenía 10 µg de enzima.

Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS): La sulfamidasa modificada se desgasificó por centrifugación a 12000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente (TA). Los experimentos de DLS se realizaron en un instrumento DynaPro 55 Titan (Wyatt Technology Corp) usando potencia láser al 25 % con 3 repeticiones de 75 µl cada vez.

Digestión en gel y análisis MALDI-TOF MS: El análisis SDS-PAGE reveló algunas bandas adicionales, que se escindieron, se decoloraron y se procesaron por digestión en gel con tripsina. El procedimiento fue el siguiente:

i. Decoloración de Coomassie: las bandas de gel extirpadas se colocaron en tubos Eppendorf. Los tubos se agitaron dos veces en NH_3HCO_3 100 mM en acetonitrilo al 50 % a 30 °C durante 1 h. Los sobrenadantes se descartaron.

5 ii. Reducción y alquilación: Las piezas de gel se deshidrataron en acetonitrilo, se secaron en un Speed Vac y posteriormente se cubrieron con DTT 10 mM en NH_3HCO_3 100 mM. Se permitió que la reducción continuara durante 1 hora a 57 °C. El sobrenadante se descartó y se reemplazó por yodacetamida 55 mM en NH_3HCO_3 100 mM. La alquilación se realizó durante 45 minutos a TA, en la oscuridad y con ligera agitación. El sobrenadante se descartó una vez más. El gel se lavó con NH_3HCO_3 100 mM en acetonitrilo al 50 % durante 20-30 minutos a 30 °C, después de lo cual se descartó el sobrenadante. Las piezas de gel se
10 secaron completamente en un Speed Vac.

iii. Digestión en gel con tripsina: Se añadieron 2-5 μl de NH_3HCO_3 50 mM a las piezas de gel secas, después de lo cual se añadieron 5 μl de solución de tripsina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en ácido acético al 1 %). Se añadió más cantidad de NH_3HCO_3 50 mM para causar hinchamiento del gel. La digestión se realizó durante una noche a 37 °C (con agitación). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con acetonitrilo al
15 60 %, TFA al 0,1 % (3 x 20 min) a TA. Los sobrenadantes resultantes se evaporaron en un Speed Vac hasta casi sequedad. La solución concentrada se mezcló 1:1 con una solución de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (10 mg/ml) y se aplicaron 0,6 μl en una placa MALDI.

Las masas moleculares de los fragmentos de péptidos tripticos se determinaron usando un espectrómetro de masas
20 de tiempo de vuelo de desorción/ionización asistida por matriz Sciex 5800 (MALDI-TOF/TOF MS). Los análisis se realizaron en modo de reflectrón de iones positivos con una energía láser de 3550 y 400 disparos.

Conservación del sitio activo: Se investigó cualquier efecto de la modificación química sobre el sitio activo de sulfamidasa mediante el uso de análisis de LC-MS y LC-MS/MS. Las muestras se prepararon de acuerdo con el
25 método LC-MS descrito en la sección *Análisis de glucosilación* en el Ejemplo 1. Los péptidos tripticos resultantes que contenían variantes de cisteína 50 (cisteína 50 (alquilada), cisteína oxidada 50, FGly50 y Ser50) se semicuantificaron usando cálculos de área pico de cromatogramas de iones reconstruidos. La identidad de los péptidos se realizó por secuenciación de MSMS. Los parámetros MSMS fueron los siguientes: las energías de colisión se ajustaron a 10, 15 y 20 V, rango de exploración 100-1800 m/z, y velocidad de exploración 1
30 exploración/s.

Resultados

Análisis SDS-PAGE: Como es evidente por el análisis de SDS-PAGE, se formaron varios péptidos de tamaños
35 distintos a partir de los de sulfamidasa de longitud completa como resultado de la modificación química (Figura 2A).

Análisis por SEC y DLS: Se encontró que el procedimiento de modificación química promueve la agregación de sulfamidasa, como se demuestra como un pre-pico en el cromatograma de la Figura 3A. Se encontró que la altura
40 máxima del pre-pico en el cromatograma era aproximadamente el 3 % de la altura del pico principal.

El análisis de DLS reveló además que el mismo material contenía el 15-20 % de proteína del contenido de proteína total en formas de alto peso molecular (es decir, por encima de 10^{10} kDa) (Figura 4A).

Análisis de bandas de SDS-PAGE: Mediante análisis MALDI-TOF MS, las cuatro bandas de gel #1-4 observadas en
45 SDS-PAGE (Figura 2A) podrían identificarse como fragmentos de sulfamidasa generados por rupturas de cadena durante la modificación química.

Las bandas de gel #1 y #2 de la Figura 2A se determinaron como dos truncamientos C-terminales con masas moleculares de 6 kDa y 30 kDa, banda de gel #3 como un truncamiento N-terminal de 41 kDa, y banda de gel #4
50 como una forma dimérica de sulfamidasa (banda de 111 kDa), formada como resultado de la modificación química (no se muestran los espectros MALDI).

Por lo tanto, se descubrió que la modificación química de sulfamidasa de acuerdo con el método conocido no solo modifica los glicanos sino que también genera rupturas de cadena en posiciones específicas en la cadena peptídica
55 de sulfamidasa.

También se descubrió que la modificación química de acuerdo con el método conocido introduce oxidación en varios residuos de metionina en sulfamidasa, en particular en metionina 184 y metionina 443, que se oxidaron casi por completo. La metionina 226 (encontrada en el péptido triptico T23, que corresponde a los residuos aminoácidos

226-238) se oxidó en un grado mucho más bajo, pero esta oxidación pareció dar lugar a una proteína más inestable que la sulfamidasa como tal, generando el truncamiento N-terminal de 41 kDa (banda de gel #3 de la Figura 2A). Por lo tanto, la oxidación de metionina 226 y rupturas de cadena parecían estar correlacionadas, como se observó en el análisis por MS. Además, la banda del dímero (#4 de la Figura 2A) también contenía predominantemente metionina oxidada 226 (Figura 2A).

En consecuencia, el procedimiento conocido para la modificación de glicanos cataliza la oxidación de restos de aminoácidos cruciales para la integridad estructural de la enzima.

10 *Conservación del sitio activo:* Además, mediante el uso de LC-MSMS, se encontró que la etapa de reducción (Figura 1A) reducía el residuo FGly en la posición del sitio activo 50 de la SEQ ID NO:1 con respecto a Ser. Ser en esta posición no es compatible con una catálisis eficiente (Recksiek et al, J Biol Chem 273(11):6096-103 (1998)). La cantidad relativa Ser producida a partir de FGly se estimó basándose en las mediciones del área pico de los iones doblemente cargados en el espectro de masas, correspondientes a los dos fragmentos de péptidos trípticos que 15 contenían FGly50 y Ser50. Las áreas pico se basaron en la respuesta de MS sin corrección por la eficiencia de la ionización. La Tabla 1 a continuación muestra que la conversión de FGly en Ser es aproximadamente del 56 % después de la modificación de acuerdo con el método conocido (véase también el Ejemplo 5, Tabla 2).

Tabla 1. Conversión de FGly en Ser en el sitio activo

Modificación química de sulfamidasa	Formación de Ser (%)	Relación FGly/Ser
Ninguna	0	
Método conocido	56,0 ± 0,3 (n = 3)	0,8

20

Por lo tanto, el procedimiento de modificación química conocido, además de las modificaciones mencionadas anteriormente, causa la reducción de restos de aminoácidos cruciales para la actividad catalítica de la enzima.

Ejemplo 4:

25

Nuevos métodos para la modificación química de sulfamidasa

Material y métodos

30 *Nuevo método 1:* La sulfamidasa producida en el sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QCMF) (Icosagen AS) de acuerdo con el Ejemplo 1, se oxidó mediante incubación con *meta*-periyodato de sodio 20 mM a 0 °C en la oscuridad durante 120 minutos en tampones de fosfato que tenían un pH de 6,0. La oxidación de glicanos se inactivó mediante la adición de etilenglicol a una concentración final de 192 mM.

35 Se dejó que la inactivación continuara durante 15 minutos a 6 °C antes de que se añadiera borohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 50 mM. Después de la incubación a 0 °C durante 120 minutos en la oscuridad, la preparación de sulfamidasa resultante se ultrafiltró frente a fosfato de sodio 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,0. El nuevo método 1 para la modificación química se representa en la Figura 1B.

40 *Nuevo método 2:* Realizado como el Nuevo método 1 con la excepción de que la concentración de borohidruro de sodio en la etapa de reducción fue de 10 mM. El nuevo método 2 para la modificación química se representa en la Figura 1C.

45 *Nuevo método 3:* La sulfamidasa producida en una línea celular estable de acuerdo con el Ejemplo 1 se oxidó mediante incubación con *meta*-periyodato de sodio 10 mM a 0 °C en la oscuridad durante 180 min en tampón de acetato que tenía un pH inicial de entre 4,5 a 5,7. La oxidación de glicanos se inactivó mediante la adición de etilenglicol a una concentración final de 192 mM. Se dejó que la inactivación continuara durante 15 minutos a 6 °C antes de que se añadiera borohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 25 mM. Después de la incubación a 0 °C durante 60 minutos en la oscuridad, la preparación de sulfamidasa resultante se 50 ultrafiltró frente a fosfato de sodio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. El nuevo método 3 para la modificación química se representa en la Figura 1D.

55 *Nuevo método 4:* La sulfamidasa producida en una línea celular estable de acuerdo con el Ejemplo 1 se oxidó mediante incubación con *meta*-periyodato de sodio 10 mM a 8 °C en la oscuridad durante 60 min en tampón de acetato que tenía un pH inicial de 4,5. La oxidación de glicanos se inactivó mediante la adición de etilenglicol a una concentración final de 192 mM. Se dejó que la inactivación continuara durante 15 minutos a 6 °C antes de que se

añadiera borohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 25 mM. Después de la incubación a 0 °C durante 60 minutos en la oscuridad, la preparación de sulfamidasa resultante se ultrafiltró frente a fosfato de sodio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

5 *Investigación de una segunda etapa de inactivación:* El efecto de inactivar la segunda etapa se investigó mediante la adición de acetona 0,1 M después de la etapa de incubación de borohidruro de sodio en el nuevo método 1. El material se produjo en paralelo de acuerdo con el nuevo método 1 hasta y incluyendo la adición e incubación de borohidruro de sodio, después de que la reacción en una muestra se inactivara mediante la adición de acetona. Ambas muestras se trataron entonces de acuerdo con la etapa de ultrafiltración en el nuevo método 1.

10

Nuevo método 5: La sulfamidasa producida en una línea celular estable de acuerdo con el Ejemplo 1 se oxidó mediante incubación con *meta*-periyodato de sodio 10 mM a 8 °C en la oscuridad durante 60 min en tampón de acetato que tenía un pH inicial de 4,5. La oxidación de glicanos se inactivó mediante la adición de etilenglicol a una concentración final de 192 mM. Se dejó que la inactivación continuara durante 15 minutos a 6 °C antes de que se añadiera borohidruro de sodio a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 25 mM. Después de la incubación a 0 °C durante 45 minutos en la oscuridad y la interrupción de la reacción con acetona 0,1 M, la preparación de sulfamidasa resultante se ultrafiltró frente a fosfato de sodio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

15

Resultados

20

Como ya se ha explicado en otra parte en el presente documento, el *meta*-periyodato de sodio es un oxidante que convierte los grupos *cis*-glicol de carbohidratos en grupos aldehído, mientras que el borohidruro es un agente reductor que reduce los aldehídos en alcoholes más inertes. La estructura de los hidratos de carbono se destruye irreversiblemente.

25

Para proporcionar un método mejorado para la modificación química de glicanos, en particular un procedimiento que proporciona una sulfamidasa modificada con propiedades mejoradas, se evaluaron diferentes condiciones de reacción. Se puede concluir que tanto la oxidación mediante *meta*-periyodato de sodio como la reducción por borohidruro de sodio introducían modificaciones y agregación de polipéptidos; propiedades que tienen un impacto negativo sobre la actividad catalítica y la propensión inmunogénica.

30

Se descubrieron las condiciones para un procedimiento de modificación química mejorado. Sorprendentemente, estas condiciones facilitaron que la etapa de reducción se pudiera realizar inmediatamente después de la etapa de inactivación de etilenglicol, omitiendo el cambio de tampón y la exposición prolongada de sulfamidasa a intermedios de aldehídos reactivos. Los nuevos procedimientos de modificación química se representan en la Figura 1B, la Figura 1C y la Figura 1D.

35

Ejemplo 5:

40 Análisis de sulfamidasa modificada de acuerdo con nuevos métodos

Material y métodos

La sulfamidasa modificada de acuerdo con los nuevos métodos del Ejemplo 4 se sometió a los siguientes análisis.

45

Análisis SDS-PAGE: Se cargaron 5 µg de sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido (Ejemplo 2), así como con el nuevo método 1 y 2 (Ejemplo 4) en pocillos individuales separados de acuerdo con la descripción en el Ejemplo 3. De forma similar, se cargaron 5 µg de sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 (Ejemplo 4), así como con el nuevo método 3, 4 y 5 en pocillos individuales separados de acuerdo con la descripción en el Ejemplo 3.

50

Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC): Se analizó la sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 - 4 mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño de acuerdo con el Ejemplo 3.

55 *Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS):* Se analizó la sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 mediante DLS de acuerdo con el Ejemplo 3.

Conservación del sitio activo: Se investigó cualquier efecto de la modificación química sobre el sitio activo de sulfamidasa, producido de acuerdo con el nuevo método 1-5, así como la segunda etapa de inactivación investigada

de acuerdo con la descripción en el Ejemplo 3.

Resultados

5 *Análisis SDS-PAGE*: Se formaron varios péptidos de tamaños distintos a partir de los de sulfamidasa de longitud completa como resultado del nuevo método 1 de modificación química (Figura 2B). Sin embargo, en comparación con la sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido, el nuevo método 1 dio lugar a una menor fragmentación. El fragmento #1 (Figura 2A), identificado como los aminoácidos C-terminales 434-482, no fue detectable en las muestras de sulfamidasa generadas por los nuevos métodos 1, 3 y 4, y las cantidades de los otros
10 fragmentos se redujeron en gran medida. Esta tendencia fue aún más pronunciada en el material producido por el nuevo método 2. Sin embargo, con el nuevo método 2, hubo más formas de alto peso molecular presentes en el gel, lo que indica que la cantidad de agente reductor no fue suficiente para reducir todos los aldehídos reactivos generados en la etapa de oxidación (datos no mostrados). Los nuevos métodos 3, 4 y 5 produjeron un material de sulfamidasa modificado que fue similar al producido por el nuevo método 1 (datos no mostrados).

15 Las rupturas de cadena en el polipéptido de sulfamidasa preparado por los nuevos métodos son, por lo tanto, limitadas en comparación con la aparición de rupturas de cadena en la sulfamidasa preparada de acuerdo con el Ejemplo 2.

20 *Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)*: Se encontró que la sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 contenía menos agregados en comparación con la sulfamidasa modificada por el método conocido. Esto se demuestra en los cromatogramas de la Figura 3, donde la forma de alto peso molecular está presente en el cromatograma como un pre-pico. La altura pico del pre-pico en la Figura 3B es del 0,5 %, con respecto a la altura pico principal, lo que representa una disminución en comparación con la altura pico (3 %) en la
25 Figura 3A. Este es también el caso de la sulfamidasa modificada por el nuevo método 3, 4 y 5 (datos no mostrados).

Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS): El análisis de DLS (Figura 4B) confirmó los resultados del análisis por SEC: la sulfamidasa producida de acuerdo con el nuevo método contenía el 5 % de proteína en formas de alto peso molecular (por encima de 10^{10} kDa). Por lo tanto, se podría concluir que la formación de formas agregadas de
30 sulfamidasa está limitada por los nuevos métodos en comparación con el método conocido (véase el Ejemplo 3).

Conservación del sitio activo: La reducción de FGly en Ser en la posición 50 en el sitio activo de sulfamidasa se determinó mediante LC-MS/MS y los péptidos tripticos que contenían FGly y Ser se identificaron positivamente. La cantidad relativa de los fragmentos peptídicos se analizó con LC-MS midiendo las áreas pico de los cromatogramas
35 de iones reconstruidos de los iones doblemente cargados (sin corrección para la eficacia de la ionización). Las muestras generadas a partir de los métodos utilizados en el Ejemplo 4 para la modificación química se prepararon y se analizaron. (Tabla 2).

Tabla 2. Conversión de FGly en Ser en el sitio activo

Modificación química de sulfamidasa	Formación de Ser (%)	Relación FGly/Ser
Ninguna	0	
Nuevo método 1	45,4 ± 0,9 (n = 3)	1,2
Nuevo método 2	11,5 ± 1,3 (n = 3)	7,7
Nuevo método 3	44,1 ± 2,0 (n = 2)	1,2
Nuevo método 4	36,1 (n = 1)	1,6
Nuevo método 5	41,7 ± 1,1 (n = 2)	1,4

40 La pérdida del sitio activo FGly está limitada considerablemente por los nuevos métodos. Los nuevos métodos de modificación de glicanos en sulfamidasa disminuyeron significativamente la cantidad de formación de Ser, del 56 % usando el método conocido (véase la Tabla 1, Ejemplo 3), al 45 %, 44 %, 36 % y 42 % (nuevo método 1, 3, 4 y 5, respectivamente, Tabla 2). La formación de Ser del nuevo método 2 fue de aproximadamente el 11 %, lo que indica
45 que la conversión de FGly en Ser era altamente dependiente de la concentración de borohidruro de sodio.

La segunda etapa de inactivación de la reacción proporcionó sulfamidasa modificada comparable con la sulfamidasa producida sin interrumpir la reacción (la sulfamidasa modificada producida de acuerdo con el nuevo método 1 tiene una formación Ser del 45 % en comparación con la formación Ser del 43 % después de interrumpir la segunda
50 reacción con acetona). Esto se confirmó adicionalmente por el nuevo método 5, que también incluye una etapa de inactivación.

Ejemplo 6:Endocitosis mediada por receptores *in vitro*

5

Material y métodos

La sulfamidasa se preparó como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 4, producida en el sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) y modificada de acuerdo con el método conocido y los nuevos métodos 1 y 2. La endocitosis se evaluó en los fibroblastos MEF-1 que expresan los receptores M6P. Las células MEF-1 se incubaron durante 24 h en medio DMEM complementado con sulfamidasa 75 nM. Las células se lavaron dos veces en DMEM y una vez en NaCl al 0,9 % antes de la lisis celular usando Triton X100 al 1 %. La actividad de sulfamidasa del lisado y el contenido total de proteína se determinaron y la actividad específica del lisado se calculó. La actividad se controló por intensidad de fluorescencia a 460 nm usando 4-metilumbeliferil-alfa-D-N-sulfoglucosaminida 0,25 mM como sustrato en ácido dietilbarbitúrico 14,5 mM, acetato sódico 14,5 mM, NaCl al 0,34 % (p/v) y BSA al 0,1 %. La concentración de proteína total se determinó usando el kit BCA (Pierce) con BSA como patrón. Los datos se presentan como media + DE (n = 4).

Resultados

20

La actividad de la sulfamidasa se pudo detectar en el homogeneizado celular para todas las preparaciones evaluadas en el ensayo de endocitosis. La sulfamidasa modificada preparada por el método conocido, así como los nuevos métodos 1 y 2 mostraron actividades específicas en homogeneizado celular por debajo del 10 % del obtenido con sulfamidasa recombinante no modificada (Figura 5). La actividad conservada en las células cargadas primero y luego cultivadas en ausencia de sulfamidasa durante 2 días fue comparable para todas las preparaciones, lo que demostraba que la modificación química no tiene un impacto negativo sobre la estabilidad lisosomal.

Por lo tanto, se puede concluir que la modificación química hace que la sulfamidasa sea menos propensa a la captación celular que es una consecuencia de la eliminación de epítomos para receptores de reconocimiento de glicanos como M6PR. A nivel macroscópico, esta pérdida de interacciones moleculares se traduce en una reducción de la depuración del plasma cuando se administra por vía intravenosa. La depuración reducida de la proteína podría permitir una dosificación menos frecuente para los pacientes.

Ejemplo 7:

35

Depuración plasmática *in vivo* de sulfamidasa modificada producida por el nuevo método 1*Material y métodos*

La depuración plasmática (CL) de la sulfamidasa recombinante no modificada y modificada producida como se describe en el Ejemplo 1, en el sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) y modificada de acuerdo con el nuevo método 1 del Ejemplo 4 se investigó en ratones (C57BL/6J). A los ratones se les administró una administración de dosis única intravenosa en la vena de la cola de 10 mg/kg de sulfamidasa y 10 mg/kg de sulfamidasa modificada. La sulfamidasa y la sulfamidasa modificada se formularon a 2 mg/ml y se administraron a 5 ml/kg. Se tomaron muestras de sangre de la vena safena o la vena cava en diferentes puntos de tiempo hasta 24 horas después de la dosis (3 ratones por punto de tiempo). La sangre se recogió en tubos de EDTA almacenados en hielo y el plasma se preparó por centrifugación. Los niveles plasmáticos de sulfamidasa y sulfamidasa modificada se analizaron mediante ECL. La depuración plasmática se calculó usando el software WinNonlin versión 6.3 (Análisis no compartimental, Phoenix, Pharsight Corp., Estados Unidos).

50

Cuantificación de sulfamidasa y sulfamidasa modificada por inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL): Se determinaron la sulfamidasa y la sulfamidasa modificada en muestras de plasma PK mediante inmunoensayo por ECL usando la plataforma Meso Scale Discovery (MSD). Una placa MSD recubierta con estreptavidina se bloqueó con Bloqueador-A al 5 % en PBS. La placa se lavó y se distribuyeron diferentes diluciones de muestras estándar y anticuerpos de anti-sulfamidasa de conejo marcados con sulfo-Ru y la placa se incubó a TA. Los complejos de sulfamidasa y anticuerpos marcados se unen a la placa recubierta con estreptavidina a través del mAb biotinilado. Después del lavado, se determinó la cantidad de complejos unidos mediante la adición de un tampón de lectura a los pocillos y la placa se leyó en un instrumento MSD Si2400. Los recuentos de ECL registrados fueron

proporcionales a la cantidad de sulfamidasa en la muestra y se evaluaron frente a un estándar de sulfamidasa relevante.

Resultados

5 La depuración plasmática en ratones de sulfamidasa modificada fue aproximadamente 10 veces menor en comparación con la sulfamidasa no modificada, véase la Tabla 3 a continuación. Esto es probablemente al menos en parte debido a la inhibición de la captación mediada por receptor en el tejido periférico después de la modificación química de la sulfamidasa (como se demuestra en los estudios de captación celular del Ejemplo 6).

10 Los datos sobre la depuración en ratones obtenidos para la sulfamidasa modificada producida en la línea celular estable de acuerdo con el Ejemplo 1 y modificada de acuerdo con el nuevo método 3 del Ejemplo 4, fueron según los datos presentados en la Tabla 3 para la sulfamidasa modificada producida en el sistema QMCF y modificada por el nuevo método 1. La depuración reducida de la proteína podría permitir una dosificación menos frecuente para los
15 pacientes.

Tabla 3. Depuración plasmática de sulfamidasa y sulfamidasa modificada

Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	DEP. plasmática (l/(h·kg))
sulfamidasa (SEQ ID NO:2)	10	0,17
sulfamidasa modificada (Nuevo método 1, SEQ ID NO:2)	10	0,014

Ejemplo 8:

20 Efecto in vivo de la sulfamidasa modificada en el depósito de heparán sulfato de cerebro

Materiales y métodos

25 Se investigó el efecto de sulfamidasa modificada administrada por vía intravenosa (i.v.) producida como se ha descrito en el Ejemplo 1, en el sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) y modificada de acuerdo con el nuevo método 1 del Ejemplo 4 en depósito de heparán sulfato cerebral *in vivo*.

30 *Preparación del artículo de ensayo:* Se formuló sulfamidasa modificada a 6 mg/ml, se filtró de forma estéril y se congeló a -70 °C hasta su uso. La sulfamidasa modificada congelada y la solución de vehículo correspondiente se descongelaron el día de la inyección a TA durante un mínimo de una hora hasta dos horas antes del uso. La clorfeniramina se disolvió en solución salina isotónica a una concentración de 0,5 mg/ml y se almacenó a -20 °C.

35 *Animales:* Se usaron ratones macho que tenían una mutación homocigota espontánea en el gen *mps3a*, B6.Cg-Sgsh^{mps3a}/PstJ (MPS IIIA) (Jackson Laboratories, ME, Estados Unidos). Los animales se alojaron individualmente en jaulas a 23 ± 1 °C y al 40-60 % de humedad, y tuvieron libre acceso a agua y pienso de laboratorio estándar. El ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h se configuró para encenderse a las 7:00 p.m. Los animales se acondicionaron durante al menos dos semanas antes de iniciar el estudio. Los hermanos de tipo silvestre de la misma camada también se incluyeron como controles. En el estudio A, los ratones tenían entre 23 y 24 semanas de edad, mientras que los
40 ratones tenían entre 9 y 10 semanas de edad en el estudio B.

Estudio del procedimiento experimental A: La sulfamidasa modificada a 30 mg/kg (n = 8) y el vehículo (n = 7) se administraron por vía intravenosa a ratones con MPS IIIA cada dos días durante veinticinco días (13 inyecciones). La clorfeniramina se dosificó (2,5 mg/kg) por vía subcutánea 30-45 minutos antes de la administración de sulfamidasa o
45 vehículo modificado. La dosificación comenzó aproximadamente a las 07.00 de la mañana. El artículo de ensayo y el vehículo se administraron a 5 ml/kg. El volumen de administración final se corrigió para el peso corporal real en cada ocasión de dosificación. Este esquema se repitió para el vehículo. El estudio finalizó 2 h después de la última inyección. Se incluyeron ratones silvestres de la misma edad no tratados (n = 5) junto con los grupos tratados con el artículo de ensayo. Los ratones se anestesiaron con isoflurano. La sangre se extrajo de la hemorragia del plexo
50 retroorbital. La perfusión fue seguida de lavado abundante de 20 ml de solución salina a través del ventrículo izquierdo del corazón. Los tejidos se diseccionaron (cerebro, hígado, bazo, pulmón y corazón), se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Los tejidos y la sangre se prepararon para medir los niveles de hexosamina N-sulfato [α -1, 4] ácido urónico (HNS-UA) usando LC-MS/MS. HNS-UA es un marcador de disacárido de depósito de heparán sulfato y, por lo tanto, una disminución en los niveles de HNS-UA refleja la degradación del
55 heparán sulfato. Los datos de HNS-UA se calcularon en unidades relativas frente a patrón interno, expresadas por mg de tejido y normalizadas con respecto al promedio del grupo control. Los datos se analizaron mediante una

prueba de ANOVA unidireccional y si la importancia general también se demostró mediante la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni para la prueba de significación entre los grupos (*P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001).

- 5 *Estudio del procedimiento experimental B:* La sulfamidasa modificada a 30 mg/kg (n = 6), 10 mg/kg (n = 6) y vehículo (n = 6) se administraron por vía intravenosa a ratones MPS IIIA una vez a la semana durante 10 semanas (10 inyecciones). La clorfeniramina se dosificó (2,5 mg/kg) por vía subcutánea 30-45 minutos antes de la administración de sulfamidasa o vehículo modificado. El volumen de administración final se corrigió para el peso corporal real en cada ocasión de dosificación. Este esquema se repitió para el vehículo. El estudio finalizó 24 h después de la última inyección. Se incluyeron ratones silvestres de la misma edad no tratados (n = 6) junto con los grupos tratados con el artículo de ensayo. Los ratones se anestesiaron con isoflurano. La sangre se extrajo de la hemorragia del plexo retroorbital. La perfusión fue seguida de lavado abundante de 20 ml de solución salina a través del ventrículo izquierdo del corazón. Los tejidos se diseccionaron (cerebro, hígado, bazo), se pesaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Los tejidos y la sangre se prepararon para medir los niveles de HNS-UA usando LC-MS/MS. Los datos de HNS-UA se calcularon en unidades relativas frente a patrón interno, expresadas por mg de tejido y normalizadas con respecto al promedio del grupo control. Los datos se analizaron mediante una prueba de ANOVA unidireccional y si la importancia general también se demostró mediante la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni para la prueba de significación entre los grupos (*P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001).
- 20 *Análisis por LC-MS/MS de HNS-UA en muestras de tejido:* Se realizó un análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) de hexosamina N-sulfato [α -1, 4] ácido urónico (HNS-UA) en muestras de tejido en parte de acuerdo con los métodos descritos por Fuller et al (Pediatr Res 56: 733-738 (2004)) y Ramsay et al (Mol Genet Metab 78:193-204 (2003)). Los tejidos (90-180 mg) se homogeneizaron en tampón sustrato (ácido dietilbarbitúrico 29 mM, acetato de sodio 29 mM, NaCl al 0,68 % (p/v), 100 ml de agua, pH 6,5) utilizando un dispositivo Lysing Matrix D (MP Biomedicals, LLC, Ohio, Estados Unidos). La homogeneización se realizó durante 25 s en un homogeneizador Savant FastPrep FP120/Bio101 (LabWrench, ON, Canadá) y el homogeneizado se centrifugó posteriormente en una centrifuga Eppendorf 5417R a 10000 rcf. El sobrenadante se evaporó casi a sequedad. Se añadieron 150 μ l de una solución derivatizante (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona (PMP) 250 mM, NH₃ 400 mM, pH 9,1) y 5 μ l de la solución madre del patrón interno disacárido condroitina Δ di-4S sodio (Δ UA-GalNAc4S, 0,1 mg/ml). La derivatización se realizó a 70 °C durante 90 min en agitación y después las soluciones se acidificaron con 200 μ l de ácido fórmico 800 mM. Se añadió agua desionizada a las muestras hasta un volumen final de 500 μ l, y la extracción se realizó con cloroformo (3 x 500 μ l) para eliminar el exceso de PMP. La centrifugación se realizó a 13000 x g durante 5 minutos y la fase superior se transfirió a un nuevo vial. Para eliminar cualquier exceso de ácido fórmico y NH₄COOH, la fase acuosa se evaporó a sequedad en un Speed Vac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY). Las muestras se reconstituyeron hasta un total de 100 μ l de acetonitrilo al 5 %/ácido acético al 0,1 %/TFA al 0,02 %.

Se realizó un análisis de LC-MS/MS en un análisis por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) de Waters, acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API 4000. El control de instrumentos, la adquisición de datos y la evaluación se realizaron con el software Analyst.

La separación por LC se realizó mediante el uso de una columna Acquity C18 CSH (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m). La fase móvil A consistía en acetonitrilo al 5 %/ácido fórmico al 0,5 %, y la fase móvil B consistía en acetonitrilo al 95 %/ácido fórmico al 0,5 %. Se usó un gradiente del 1 % al 99 % de B en 7 minutos a un caudal de 0,35 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 μ l. El API 4000 se hizo funcionar en modo de control de reacción múltiple (MRM) de ión negativo de electronebulización. La tensión de pulverización de iones se hizo funcionar a 4,5 kV, y la temperatura de origen fue de 450 °C. Se usó argón como gas de colisión. La energía de colisión fue de 34 V. Las transiciones de MRM fueron 764,4/331,2 (PMP-HNS-UA) y 788,3/534,3 (PMP-patrón interno). La cantidad relativa del HNS-UA se calculó con respecto al nivel del patrón interno.

50 Resultados

Los resultados del estudio A mostrado en la Figura 6A ilustran que la sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 disminuyó los niveles de HNS-UA en el cerebro en un 30 % después de la administración intravenosa repetida cada dos días durante 25 días (13 dosis) a 30 mg/kg.

Además, el tratamiento con la sulfamidasa modificada suprimió totalmente los niveles de HNS-UA en el hígado (Figura 6B) y el pulmón (no mostrado).

Los resultados del estudio B se muestran en la Figura 6C e ilustra que la sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 disminuyó los niveles de HNS-UA en el cerebro en un 48 % y un 14 % después de la administración intravenosa repetida una vez a la semana durante 10 semanas a 30 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente.

5 Por lo tanto, estos resultados demuestran que una proteína sulfamidasa modificada de acuerdo con el nuevo método 1 descrito en el presente documento causa, después del tratamiento a largo plazo, una fuerte reducción de los niveles de HNS-UA en el cerebro, así como una reducción esencialmente completa de los niveles de HNS-UA en órganos periféricos.

10 Ejemplo 9:

Optimización de la modificación de sulfamidasa

El proceso de modificación química generalmente se puede dividir en dos partes, donde la etapa de oxidación es la primera etapa, denominada R1 en lo sucesivo en el presente documento, y la reducción es la segunda etapa, denominada R2. Para optimizar las dos etapas, se configuró un diseño de experimento (DoE) de factor completo que investiga el efecto de la temperatura, la concentración y el tiempo para las dos etapas.

Materiales y métodos

20 La sulfamidasa producida como se describe en el Ejemplo 1 en un sistema de expresión episomal Quattromed Cell Factory (QMCF) (Icosagen AS) se modificó esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 para el nuevo método 1, sin embargo, los parámetros sometidos a investigación se variaron de acuerdo con la Tabla 4 (a continuación). La investigación de R1 se realizó con el mismo tratamiento de reducción y parámetros que se describe en el Ejemplo 4 (método 1). Los criterios de valoración para el análisis son el grado de oxidación de los glicanos descritos en el Ejemplo 1, y el nivel de captación celular de la proteína modificada, descrito en el Ejemplo 6.

Tabla 4: Parámetros variados en R1 y R2

Variable	R1	R2
T (°C)	0, 8, 22	0, 8, 22
t (min)	30, 60, 120	30, 60, 120
c (mol/l)	10, 20, 40	1,2x(c en R1), 2,5x(c en R1), 5x(c en R1)

30 El número de parámetros y el tipo de diseño seleccionado produce diez experimentos para cada etapa, cuyos resultados se evaluaron usando el software MODDE 10 (Umetrics AB).

Además, la influencia de la segunda etapa de inactivación se ensayó en la sulfamidasa producida con los parámetros de R1 a 8 °C, 60 min y *meta*-periyodato de sodio 20 mM. Se realizaron dos reacciones adicionales en paralelo al experimento DoE y se inactivaron usando acetona 0,1 M o mediante la adición de ácido acético hasta que se obtuvo un pH de 6,0 o inferior. El tratamiento final siguió el esquema para las demás reacciones. La sulfamidasa producida de este modo se evaluó usando el método SDS-PAGE descrito en el Ejemplo 5.

Los experimentos R2 se realizaron con sulfamidasa modificada de acuerdo con los parámetros que se encontraron óptimos después del análisis del DoE de R1.

Resultados

Los resultados de R1 se resumen en la tabla 5 a continuación:

Tabla 5: Experimentos R1 y resultados

Parámetros variados			N-glicano (natural) original restante (%)				Captación celular
T (°C)	t (min)	c (mmol/l)	N(21)	N(131)	N(244)	N(393)	% de captación de sulfamidasa no modificada
0	30	10	0	0,9	0	0	12
0	120	10	0	0,4	0	0	9,5
22	30	10	0	0,2	0	0	7,1
22	120	10	0	0,1	0	0	8,5

0	30	40	0	0,3	0	0	3,8
0	120	40	0	0,1	0	0	3,5
22	30	40	0	0,1	0	0	2,7
22	120	40	0	0,01	0	0	3,5
8	60	20	0	0,2	0	0	6,1
8	60	20	0	0,2	0	0	6,5

Además, se realizó un análisis de glucosilación de acuerdo con el Ejemplo 1 para la sulfamidasa modificada de acuerdo con el método conocido. No se detectaron N-glicanos originales restantes en los sitios de N-glucosilación N(21), N(131), N(244) y N(393).

5

La evaluación de MODDE de R1 (oxidación) mostró un punto óptimo para R1 a una temperatura de aproximadamente 8 °C, una duración de reacción de aproximadamente 1 h y una concentración de aproximadamente 10 mmol/l de *meta*-peróxido de sodio. La salud global de la proteína (por ejemplo, la integridad estructural) parece beneficiarse de la concentración de oxidante más baja posible que todavía limita la captación celular a través de receptores de reconocimiento de glicanos al nivel del nuevo método 1 (véase el Ejemplo 6 para más detalles).

10

Entre las diversas condiciones descritas para R1, el tiempo de reacción se consideró como un parámetro importante para el grado de modificación de glicanos. Además, la concentración de peróxido puede influir en el grado de modificación de glicanos.

15

Por lo tanto, el diseño R2 (reducción) utilizó los parámetros preferidos identificados anteriormente para R1, es decir, se usó para la oxidación de sulfamidasa. El criterio de valoración crítico para R2 es el contenido de FGly, ya que se encontró que influía en la actividad de la sulfamidasa modificada (véanse los Ejemplos 3 y 5). Véase la Tabla 6 a continuación para obtener resultados. La cantidad relativa de los fragmentos peptídicos que contenían FGly50 y Ser50 se analizó con LC-MS midiendo las áreas pico de los cromatogramas de iones reconstruidos (sin corrección para la eficacia de la ionización).

20

Tabla 6. Resumen de DoE para R2 y experimentos confirmatorios

Parámetros variados			Sitio activo	
t (min)	T (°C)	c (mmol/l)	Formación de Ser (%)	Relación FGly/Ser
30	0	12	10	9,0
90	0	12	11	8,1
30	22	12	15	5,7
90	22	12	17	4,9
30	0	50	40	1,5
90	0	50	50	1,0
30	22	50	64	0,6
90	22	50	72	0,4
60	8	25	42	1,4
30	0	20	25	3,0
30	0	50	45	1,2
60	0	15	15	5,7
60	0	25	33	2,0
60	8	12	15	5,7
60	8	50	62	0,6

25

El DoE para R2 mostró que la formación de Ser está relacionada con la concentración de borohidruro de sodio y la temperatura. Teniendo en cuenta la formación de Ser y la presencia de formas de alto peso molecular (datos no mostrados, los resultados son análogos a los recibidos para el nuevo método 2 en el Ejemplo 4), las condiciones preferidas para R2 son una temperatura de aproximadamente 0 °C, una duración de la reacción de aproximadamente 1 hora o menos, y una concentración de borohidruro sódico de más de 12 mmol/l e incluso 50 mmol/l inclusive.

30

Se confirmó en SDS-PAGE (datos no mostrados) que la sulfamidasa producida en una reacción en la que la etapa de reducción se inactivó era comparable con la sulfamidasa producida sin inactivación. Esto indica que la

introducción de la segunda etapa de inactivación no afecta negativamente a la calidad del material ya sea mediante la inactivación con acetona 0,1 M o mediante la reducción del pH por debajo de 6 mediante la adición de ácido acético.

5 Ejemplo 10:

Análisis de la estructura de glicano después de la modificación química de sulfamidasa de acuerdo con un método conocido previamente

10 *Material y métodos*

Modificación química de acuerdo con el método conocido: La modificación química de la sulfamidasa de acuerdo con el método conocido se realizó como se describe en el Ejemplo 2.

15 *Análisis de glucosilación:* El análisis de la estructura de glicano en sulfamidasa después de la modificación química se realizó de acuerdo con el método de LC-MS descrito en el Ejemplo 1.

Las modificaciones resultantes en los restos de glicano en los cuatro fragmentos peptídicos trípticos que contienen los sitios de N glucosilación N(21), N(131), N(244) y N(393) descritos en el Ejemplo 1 se investigaron mediante
20 análisis por LC-MS.

Resultados

Análisis de glucosilación: Como se describe en el Ejemplo 1, el tipo de glucosilación que se encuentra en los cuatro
25 sitios de glucosilación antes de la modificación química era predominantemente de glicanos complejos en N(21) y N(393), y de tipo oligomanosa de glicanos en N(131) y N(244).

Después de la modificación química, se realizó una caracterización detallada de la estructura de glicano modificada en los glucopéptidos modificados químicamente más abundantes (los glicanos menos abundantes no fueron
30 detectables debido a la disminución significativa de la sensibilidad como resultado de una mayor heterogeneidad de los glicanos después de la modificación química). En este Ejemplo, se investiga la modificación en el Man-6 glicano después de la modificación química de acuerdo con el método conocido.

El tratamiento con peryodato de glicanos escinde los enlaces de carbono entre dos grupos hidroxilo adyacentes de
35 los restos de carbohidrato y altera la masa molecular de la cadena de glicano. La Figura 8A ilustra un ejemplo de rupturas de enlace predichas en la manosa después de la modificación química. La Figura 8B representa un modelo de Man-6 glicano que muestra las rupturas de enlace teóricas que pueden tener lugar después de la oxidación con peryodato de sodio.

40 En la Figura 9 se muestran los espectros de masas del péptido tríptico NITR con Man-6 glicano unido a N(131) (T13 + Man-6 glicano), antes y después de la modificación química de acuerdo con el método previamente conocido. Se identificaron los iones correspondientes al glucopeptido químicamente modificado con diversos grados de ruptura de enlace. Para Man-6 glicano, teóricamente puede haber un máximo de 3 rupturas de doble enlace y una ruptura de enlace sencillo. Cuando la modificación se realizó de acuerdo con el método conocido, se encontró que la señal de
45 iones más intensa en el espectro de masas correspondía a 2 rupturas de doble enlace y 2 rupturas de enlace sencillo, mientras que la segunda señal de ión más intensa correspondía a 3 rupturas de doble enlace y una ruptura de enlace sencillo, que es la ruptura de enlace más extensa posible. En la Figura 10A se muestra un diagrama que visualiza el grado de ruptura de enlace encontrado en T13+Man-6 glicano después de la modificación química de acuerdo con el método conocido (debido a la distribución isotópica de los iones observados, los resultados son
50 aproximados pero comparables). La reproducibilidad de la modificación química se ensayó usando tres lotes diferentes de sulfamidasa modificada químicamente producida de acuerdo con el método previamente conocido. Los iones correspondientes a diferentes grados de ruptura de enlace mostraron una distribución muy similar en los espectros de MS de los tres lotes diferentes.

55 Ejemplo 11:

Análisis de la estructura de glicano después de la modificación química de sulfamidasa de acuerdo con los nuevos métodos 1, 3, y 4.

Nuevos métodos 1, 3, y 4: Las modificaciones químicas de la sulfamidasa de acuerdo con los nuevos métodos se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.

5 *Análisis de glucosilación:* El análisis de glucosilación se realizó de acuerdo con el método de LC-MS descrito en el Ejemplo 1. Las modificaciones resultantes en las variantes de glicano de los cuatro fragmentos peptídicos trípticos que contenían los sitios de N glucosilación N(21), N(131), N(244) y N(393) se investigaron mediante análisis por LC-MS.

Resultados

10

Análisis de glucosilación: Se realizó una caracterización detallada del perfil de glicano modificado sobre sulfamidasa, químicamente modificada de acuerdo con los nuevos métodos 1, 3 y 4, en los glucopéptidos químicamente modificados más abundantes. En este Ejemplo 11, se investigó la modificación en el Man-6 glicano después de la modificación química de acuerdo con los nuevos métodos 1, 3 y 4.

15

Se identificaron los iones correspondientes al glucopéptido modificado químicamente T13+Man-6 glicano con diversos grados de ruptura de enlace. Teóricamente puede haber un máximo de 3 rupturas de doble enlace y una ruptura de enlace sencillo (véase la Figura 8B, un modelo de Man-6 glicano que muestra que es posible que se produzcan rupturas de enlace después de la oxidación con peryodato de sodio). Cuando la modificación se realizó de acuerdo con el nuevo método 1, se encontró que la señal de iones más intensa en el espectro de masas correspondía a una ruptura de doble enlace y 3 rupturas de enlace sencillo, mientras que la segunda señal de iones más intensa correspondía a 2 rupturas de doble enlace y 2 rupturas de enlace sencillo. Cuando la modificación se realizó de acuerdo con los nuevos métodos 3 y 4, las rupturas de enlace en el Man-6 glicano se cambiaron adicionalmente para obtener preferiblemente rupturas de enlace sencillo. En la Figura 10A se muestra un diagrama que visualiza el grado de ruptura de enlace del péptido tríptico T13+Man-6 glicano después de la modificación química.

La reproducibilidad de la modificación química se ensayó usando triplicados (nuevo método 1) o duplicados (nuevo método 3) de sulfamidasa químicamente modificada.

30

Cuando se compararon las modificaciones de Man-6 glicano resultantes de la sulfamidasa químicamente modificada de acuerdo con el método conocido con las modificaciones del Man-6 glicano resultantes de la sulfamidasa químicamente modificada de acuerdo con los nuevos métodos 1, 3 y 4, hubo una gran diferencia en grado de ruptura de enlace. Esto se ilustra en la Figura 10A, donde se representa la distribución de los diferentes grados de ruptura de enlace para los cuatro métodos (debido a la distribución isotópica de los iones observados, los resultados son aproximativos, pero comparables).

35

La Figura 10B muestra la abundancia relativa de rupturas de enlace sencillo para los métodos usados. El método conocido previamente proporciona una sulfamidasa modificada que tiene el 45 % de ruptura de enlace sencillo en el Man-6-glicano investigado, mientras que los nuevos métodos 1, 3 y 4 tienen el 70, 80 y el 82 % de ruptura de enlace sencillo, respectivamente, después de la modificación química.

40

REIVINDICACIONES

1. Una sulfamidasa modificada que no comprende sustancialmente epítomos para receptores de reconocimiento de glicano, en la que los restos de glicano naturales de dicha sulfamidasa se interrumpen mediante rupturas de enlace sencillo y rupturas de dobles enlaces, siendo la extensión de las rupturas de enlace sencillo por rupturas de enlace total de al menos el 60 % en oligomanosa glicanos, permitiendo de ese modo el transporte de dicha sulfamidasa a través de la barrera hematoencefálica de un mamífero, en el que dicha sulfamidasa tiene actividad catalítica en el cerebro de dicho mamífero.
- 10 2. La sulfamidasa modificada de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un contenido relativo de restos de glicano naturales intactos restantes de aproximadamente el 25 % del contenido de restos de glicano naturales en sulfamidasa recombinante no modificada.
3. La sulfamidasa modificada de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, o un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO:1, en la que dichos epítomos están ausentes en al menos cuatro de los cinco sitios de N-glicosilación: N en la posición 21 (N(21)), N en la posición 122 (N(122)), N en la posición 131 (N(131)), N en la posición 244 (N(244)), y N en la posición 393 (N(393)) de la SEQ ID NO:1.
- 15 20 4. La sulfamidasa modificada de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende un oligomanosa glicano en el sitio N(131), estando dicha oligomanosa interrumpida por rupturas de enlace sencillo y rupturas de doble enlace, estando la interrupción **caracterizada por** un grado de ruptura de enlace sencillo de al menos el 60 %.
- 25 5. La sulfamidasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, que comprende un residuo de C α -formilglicina en la posición 50 de SEQ ID NO:1 (FGly50) que proporciona dicha actividad catalítica.
6. Una composición de sulfamidasa que comprende sulfamidasa modificada no tiene sustancialmente epítomos para receptores de reconocimiento de glicano, en la que los restos de glicano naturales de dicha sulfamidasa se interrumpen mediante rupturas de enlace sencillo y rupturas de dobles enlaces, siendo la extensión de las rupturas de enlace sencillo por rupturas de enlace total de al menos el 60 % en oligomanosa glicanos, permitiendo de ese modo el transporte de dicha sulfamidasa a través de la barrera hematoencefálica de un mamífero, y que tiene una relación C α -formilglicina (FGly) con respecto a serina (Ser) en el sitio activo que es mayor de 1, proporcionando de este modo actividad catalítica en el cerebro de dicho mamífero.
- 30 35 7. Un método para preparar una sulfamidasa modificada, comprendiendo dicho método:
- a) hacer reaccionar una sulfamidasa glucosilada con un peryodato de metal alcalino durante un periodo de tiempo de no más de 4 h, y
- 40 b) hacer reaccionar dicha sulfamidasa con un borohidruro de metal alcalino durante un periodo de tiempo de no más de 2 h;
- modificando de este modo los restos de glicano de la sulfamidasa y reduciendo la actividad de la sulfamidasa con respecto a los receptores de reconocimiento de glicano, mientras se conserva la actividad catalítica de dicha sulfamidasa, en el que dicha sulfamidasa modificada muestra actividad catalítica en el cerebro de un mamífero.
- 45 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho borohidruro se usa a una concentración de entre 10 y 80 mM.
- 50 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la etapa a) se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 3 h, tal como no más de 2 h, tal como no más de 1 h, tal como alrededor de 0,5 h.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que la etapa a) y la etapa b) se realizan en secuencia sin realizar una etapa intermedia.
- 55 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que la etapa a) está **caracterizada** adicionalmente **por** al menos una de, tal como al menos dos, tal como cada una de i)-iii):
- i) dicho peryodato de metal alcalino es *meta*-peryodato de sodio;

ii) dicho peryodato se usa a una concentración de no más de 20 mM, tal como no más de 15 mM, tal como aproximadamente 10 mM, y

iii) dicha reacción se realiza a una temperatura de entre 0 y 22 °C, tal como una temperatura de 0-8 °C, tal como a una temperatura de 0-4 °C, como aproximadamente 8 °C, tal como aproximadamente 0 °C.

5

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que la etapa b) está **caracterizada** adicionalmente **por** al menos una de, tal como al menos dos, tal como cada una de i)-iv):

i) dicho borohidruro de metal alcalino es borohidruro de sodio;

10

ii) dicho borohidruro se usa a una concentración de no más de 4 veces la concentración de dicho peryodato, tal como no más de 3 veces la concentración de dicho peryodato, tal como no más de 2,5 veces la concentración de dicho peryodato, tal como de 0,5 a 4 veces la concentración de dicho peryodato;

iii) dicha reacción se realiza durante un periodo de tiempo de no más de 1,5 h, tal como no más de 1 h, tal como no más de 0,75 h, tal como aproximadamente 0,5 h, y

15

iv) dicha reacción se realiza a una temperatura de entre 0 y 8 °C.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, que comprende adicionalmente a2) la interrupción de la reacción resultante de la etapa a) y/o b2) la interrupción de la reacción resultante de la etapa b).

20

14. Una sulfamidasa modificada que puede obtenerse mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-13.

25

15. La composición de sulfamidasa o sulfamidasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 14, para su uso en terapia.

16. La composición de sulfamidasa o sulfamidasa modificada de acuerdo con la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de un mamífero afectado por enfermedad por depósito lisosomal, en particular mucopolisacaridosis IIIA (MPS IIIA).

30

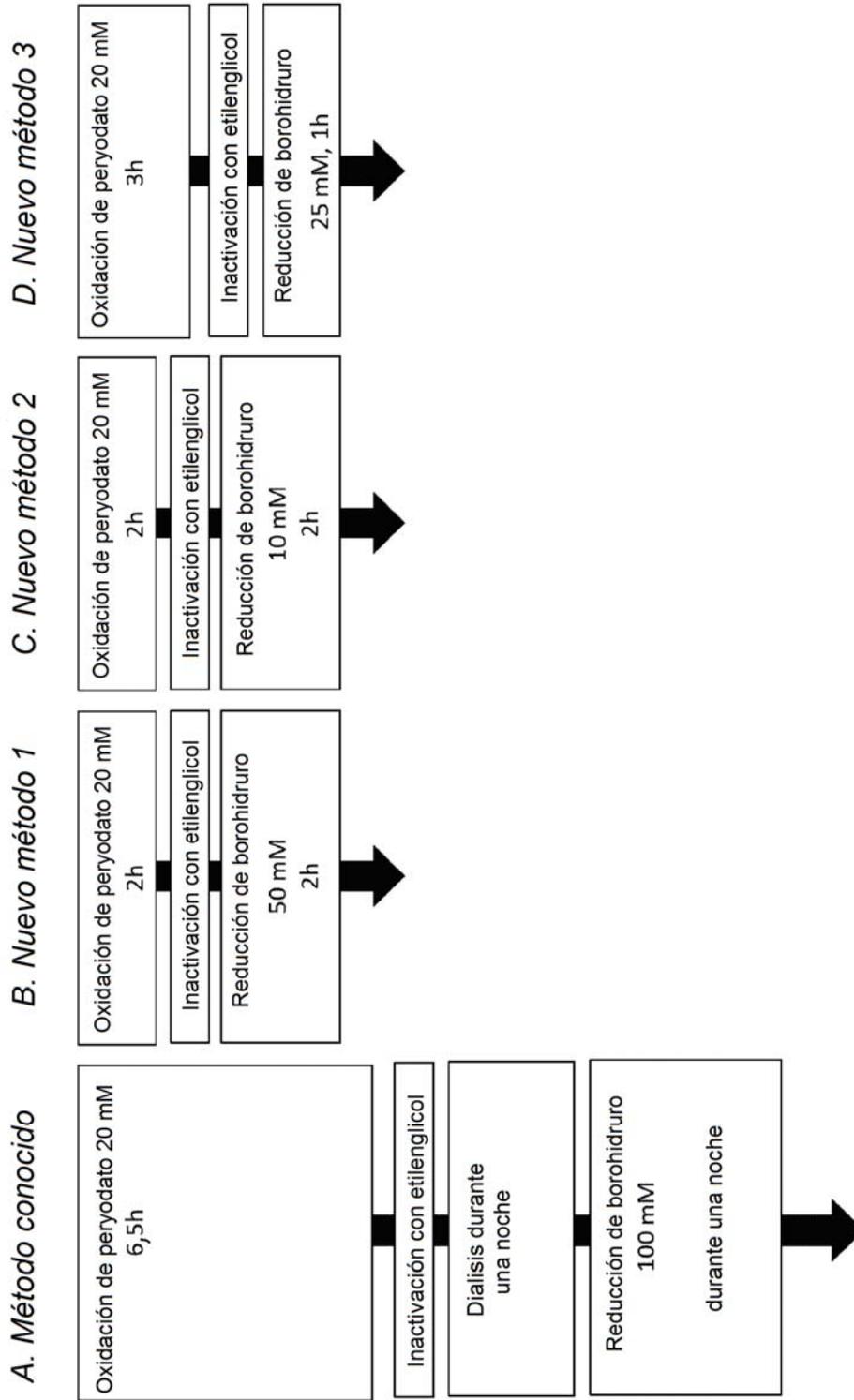
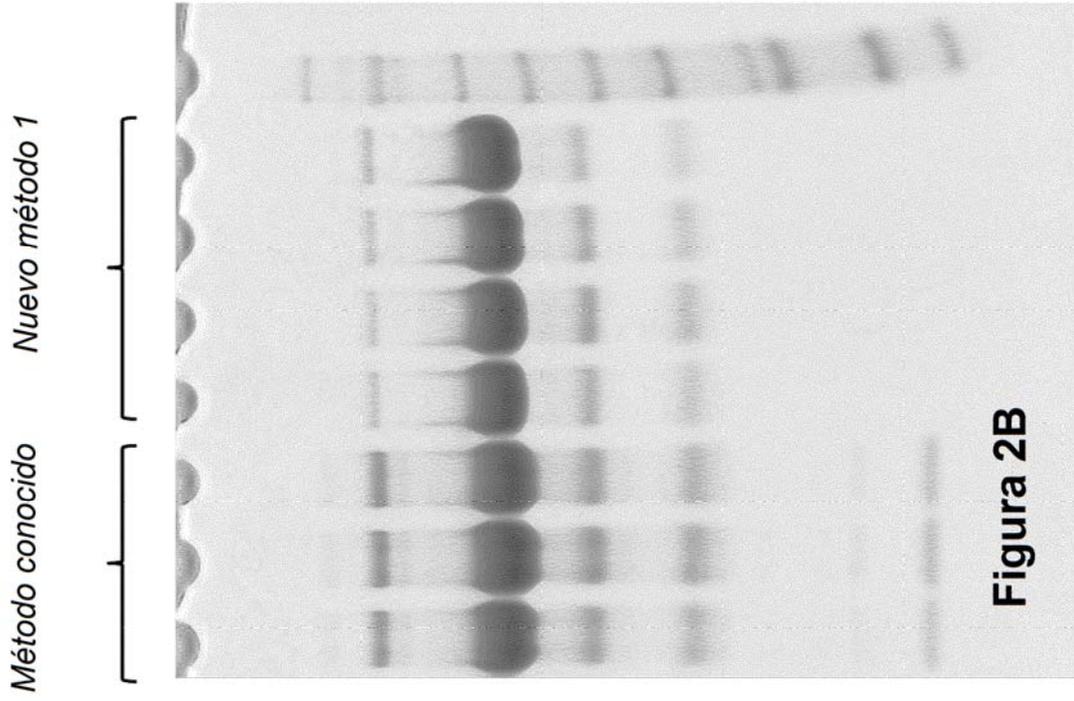


Figura 1



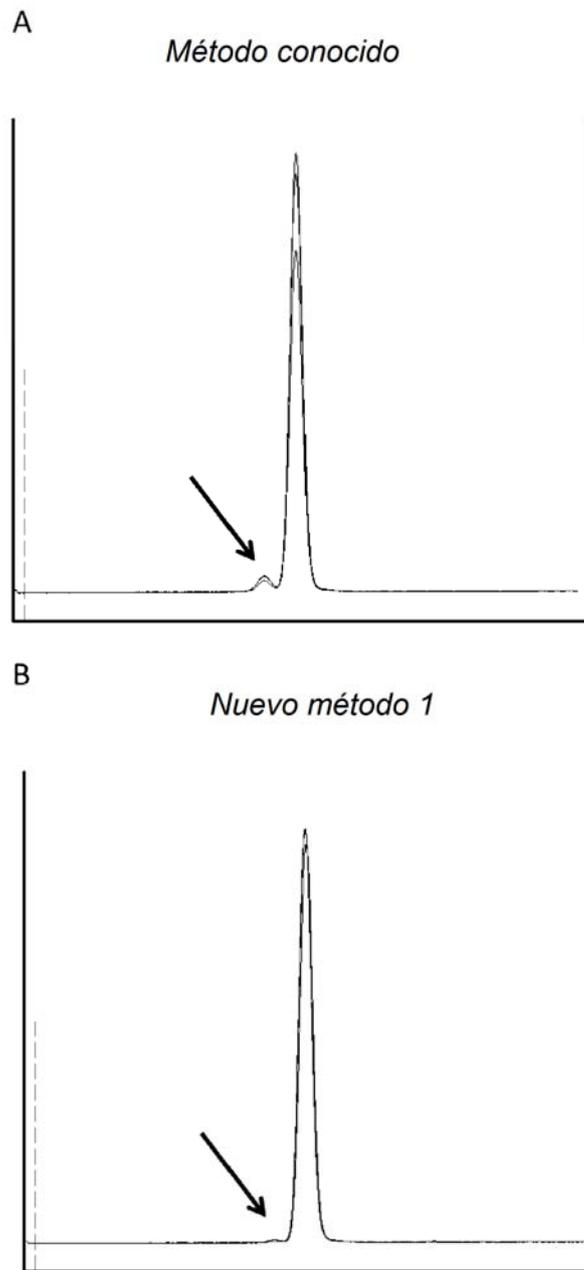


Figura 3

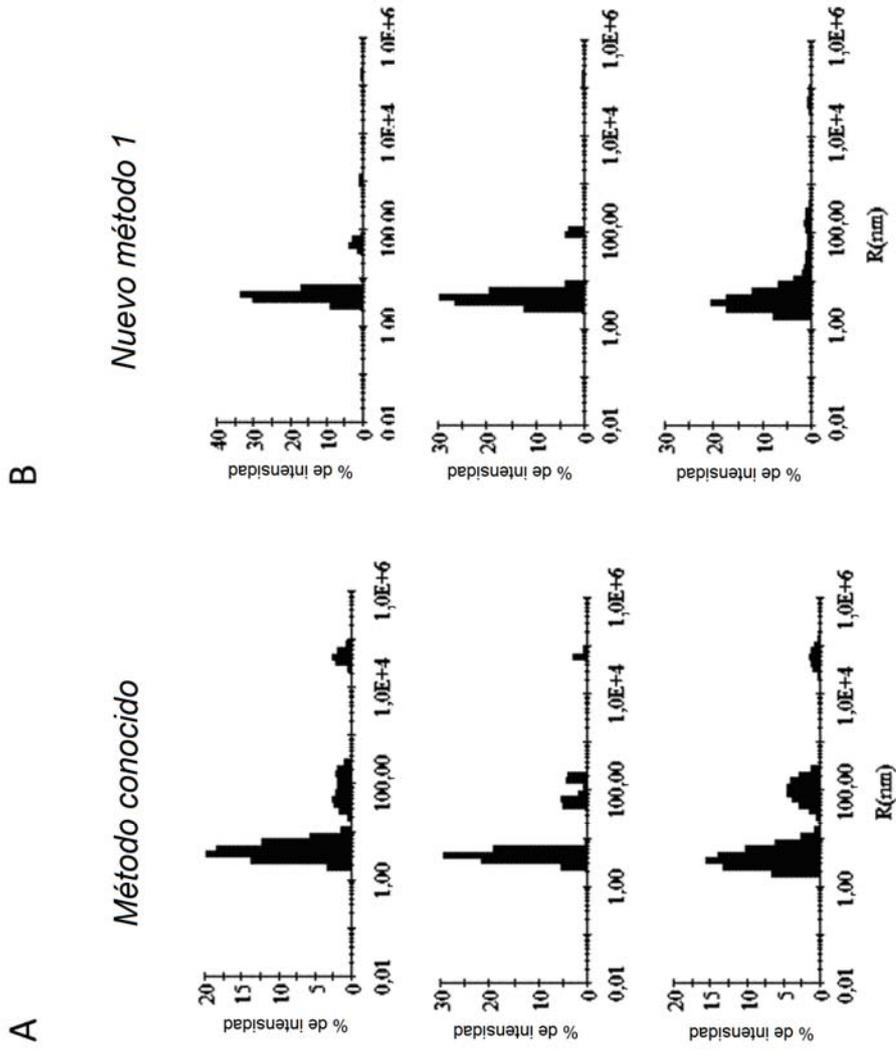


Figura 4

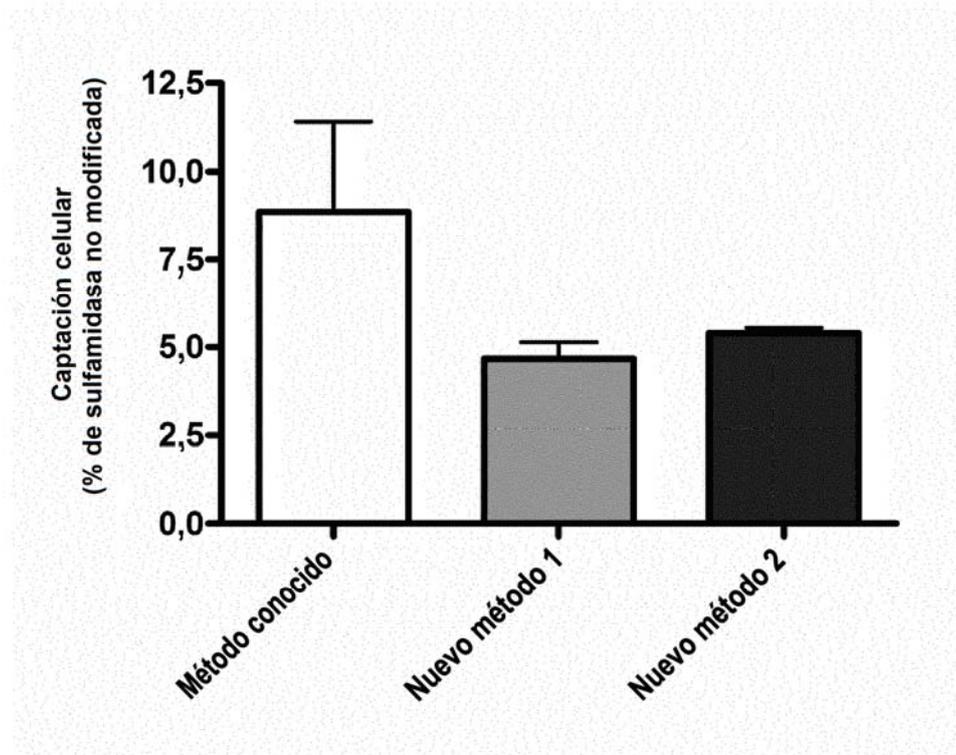


Figura 5

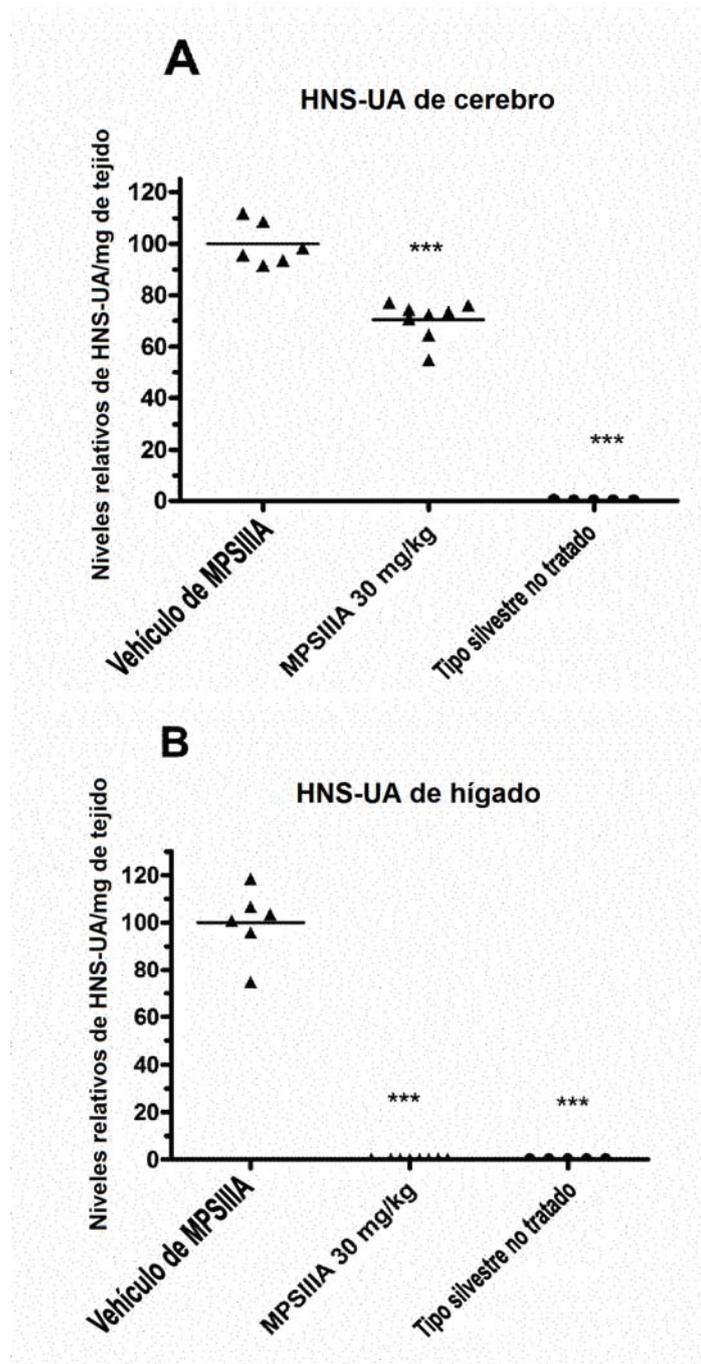


Figura 6

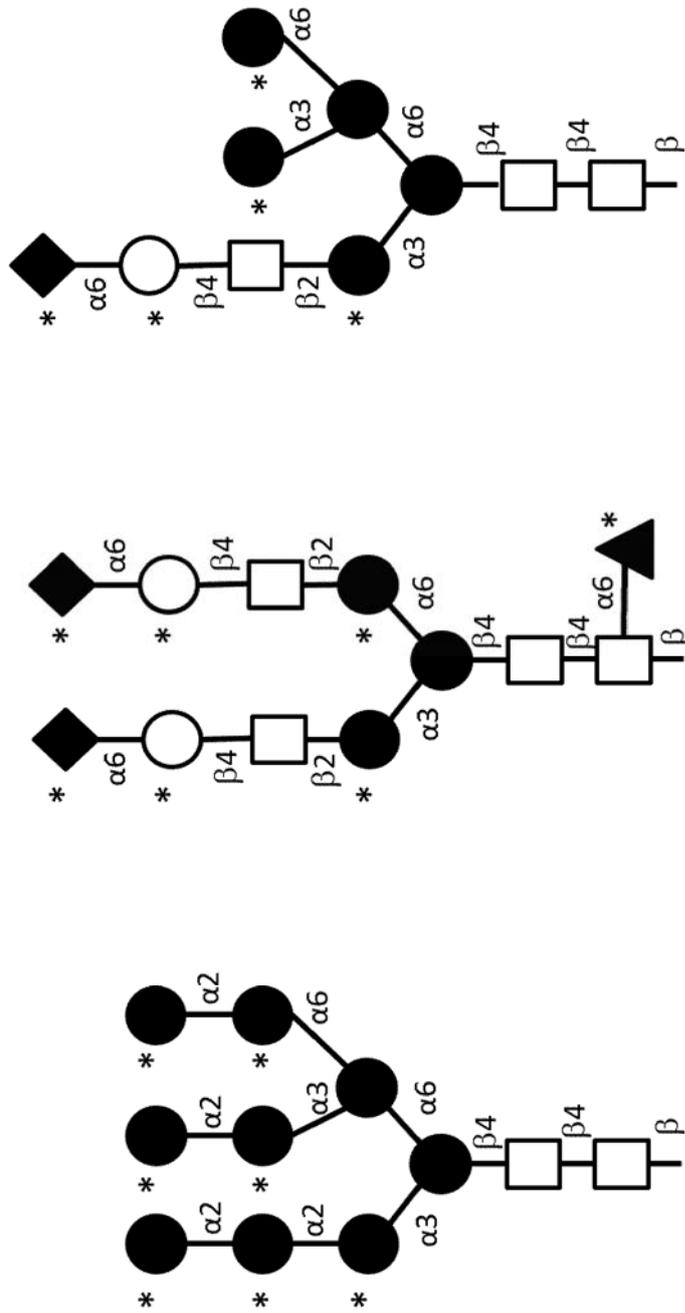


Figura 7

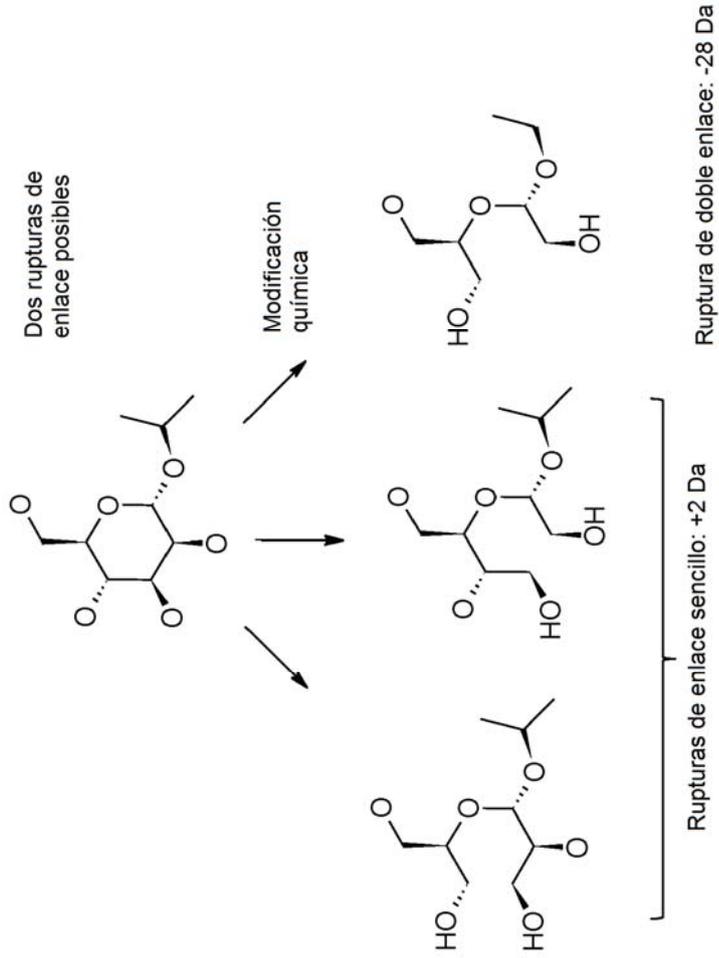


Figura 8A

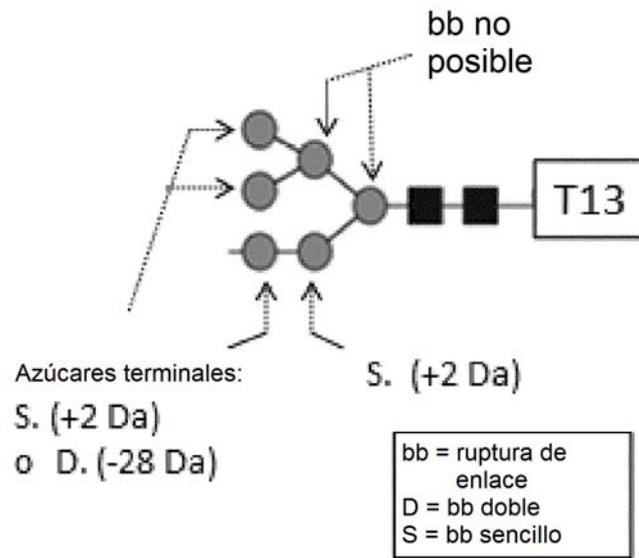


Figura 8B

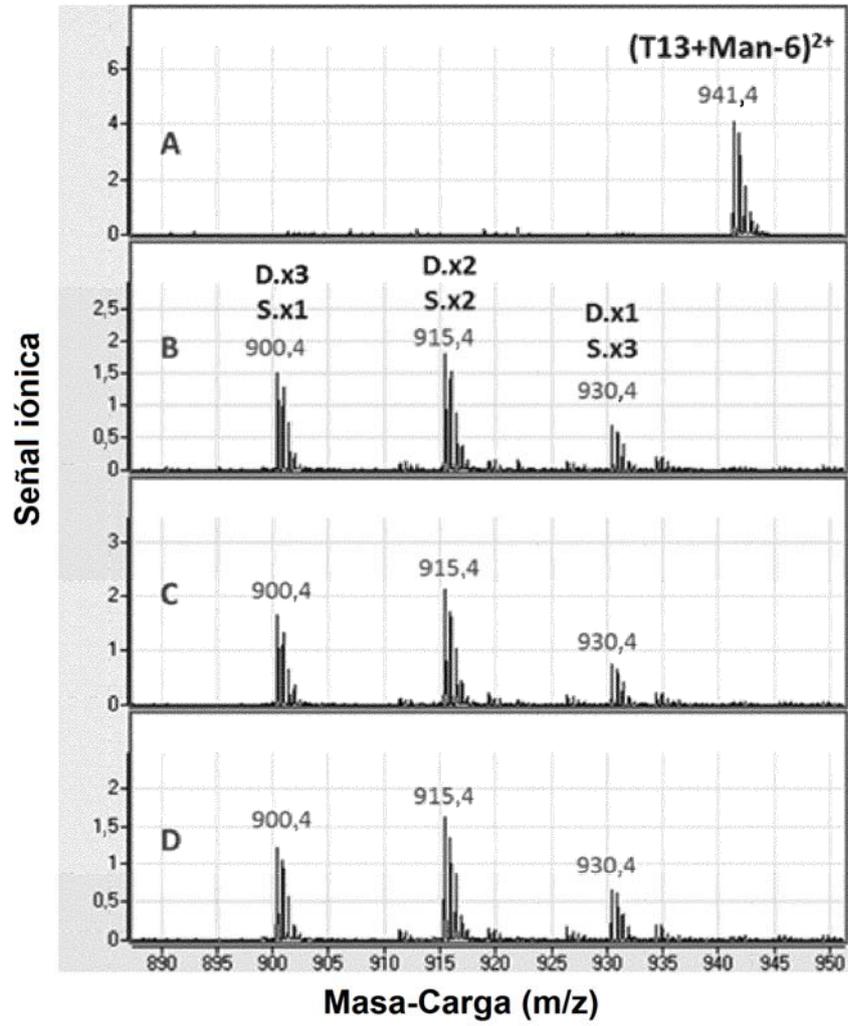
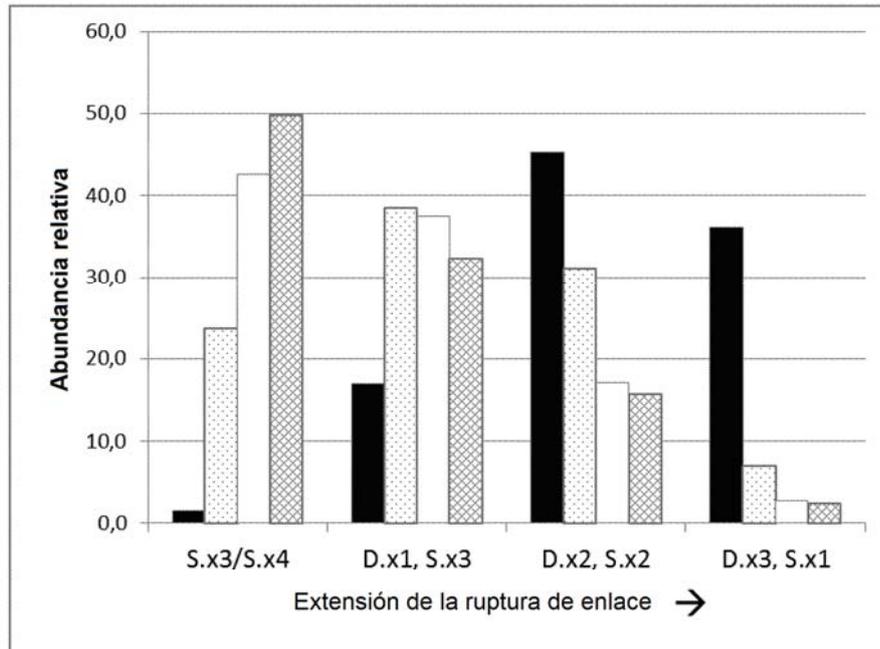
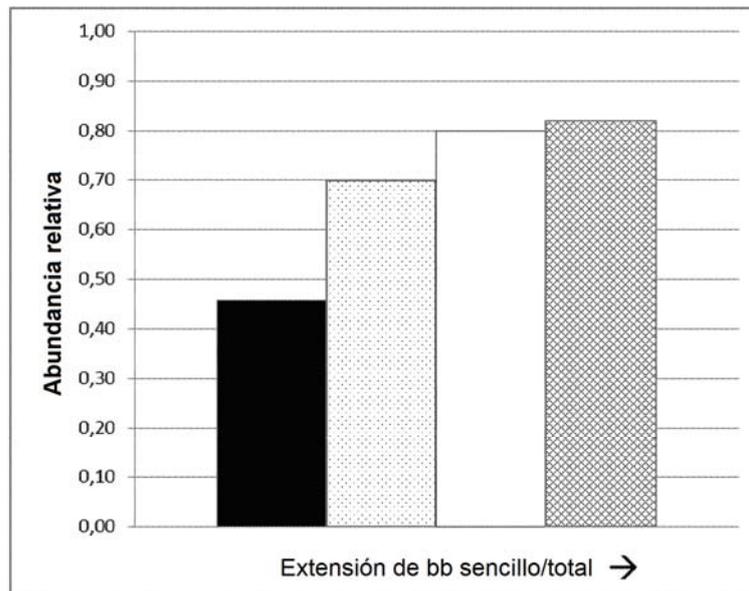


Figura 9



A



B

Figura 10

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Nombre
1	RPRNALLLADGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONG MYGLHQDVHFNFSFDKVRSLPLLSSQAGVRTGIIGKKHVGPEYVYDFDAYTEENGSLVQVGRNITRI KLLVRKFLQTQDDRRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTCEKFGNGESGMGRIPDWTTPQAYDPLDV LVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVQLERDAGVLDLTVIFTSNDGIPFSSGRTNL YW PGTAPELLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAFGSKTIHLTGRSLLPALEAEP LWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPFTQDLLNRTTAGQPTG WYKDLRHYRWRWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSQCCQPLHNEL	PBV2351
2	GSRPRNALLLADGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONG NGMYGLHQDVHFNFSFDKVRSLPLLSSQAGVRTGIIGKKHVGPEYVYDFDAYTEENGSLVQVGRNI TRIKLLVRKFLQTQDDRRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTCEKFGNGESGMGRIPDWTTPQAYDPL DVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVQLERDAGVLDLTVIFTSNDGIPFSSGRTNL YWPGTAEPLLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAFGSKTIHLTGRSLLPALEA EPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPFTQDLLNRTTAGQPTG TGWYKDLRHYRWRWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPD GVLEEKLSQCCQPLHNEL	pBV1968
3	RPRNALLLADGGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONG MYGLHQDVHFNFSFDKVRSLPLLSSQAGVRTGIIGKKHVGPEYVYDFDAYTEENGSLVQVGRNITRI KLLVRKFLQTQDDRRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTCEKFGNGESGMGRIPDWTTPQAYDPLDV LVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVQLERDAGVLDLTVIFTSNDGIPFSSGRTNL YW PGTAPELLVSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAFGSKTIHLTGRSLLPALEAEP LWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPFTQDLLNRTTAGQPTG WYKDLRHYRWRWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSQCCQPLHNELGS	pBV1803

Figura 11