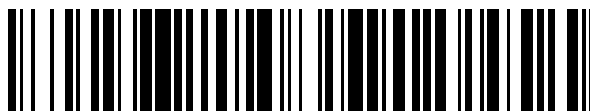


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 671**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2005 E 12177827 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2532742**

54 Título: **Arilsulfatasa A recombinante para reducir los niveles de galatosil sulfátidos en un sujeto**

30 Prioridad:

30.01.2004 DK 200400144

30.01.2004 US 540061 P

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

26.10.2018

73 Titular/es:

**SHIRE PHARMACEUTICALS IRELAND LIMITED
(100.0%)**

**5 Riverwalk Citiwest Business Campus
Dublin 24 , IE**

72 Inventor/es:

**FOGH, JENS;
ANDERSSON, CLAES;
HYDEN, PIA;
MÖLLER, CHRISTER y
WEIGELT, CECILIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 687 671 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

Arilsulfatasa A recombinante para reducir los niveles de galatosil sulfátidos en un sujeto

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la enzima arilsulfatasa A recombinante (rASA) y al uso de rASA para prevenir o aliviar los síntomas relacionados con la leucodistrofia metacromática.

10 Antecedentes de la invención

Metabolismo de la mielina y leucodistrofia metacromática

15 La leucodistrofia metacromática (LDM) está causada por un defecto genético autosómico recesivo en la enzima lisosomal arilsulfatasa A (ASA), que produce una degradación progresiva de las membranas de la vaina de mielina (desmielinización) y acumulación de galactosil sulfátidos (sulfato de cerebrósido) en la sustancia blanca tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico. En preparaciones histológicas, el galactosil sulfátido forma masas granulares esféricas que se tiñen metacromáticamente. El galactosil sulfátido también se
20 acumula dentro del riñón, la vesícula biliar y algunos otros órganos viscerales, y se excreta en cantidades excesivas en la orina.

La deficiencia múltiple de sulfatasa (DMS) es una forma rara de LDM que también incluye características de la mucopolisacaridosis (MPS). La DMS se caracteriza por una actividad disminuida de todas las sulfatasas conocidas. El fenotipo clínico de la DMS combina características de la LDM con las de la MPS como resultado del catabolismo
25 lisosómico alterado de los glucolípidos sulfatados y los glicosaminoglicanos.

El galactosil sulfátido se metaboliza normalmente mediante la hidrólisis del enlace 3-O-sulfato para formar galactocerebrósido a través de la acción combinada de la enzima lisosomal arilsulfatasa A (EC 3,1.6,8) (Austin et al. Biochem J. 1964, 93, 15C-17C) y una proteína activadora de esfingolípidos llamada saposina B. Una profunda
30 deficiencia de arilsulfatasa A se produce en todos los tejidos de pacientes con las formas infantil tardía, juvenil y adulta de LDM (véase más adelante). A continuación, la proteína arilsulfatasa A se denominará "ASA" y la saposina B se denominará "Sap-B". Una profunda deficiencia de ASA se produce en todos los tejidos de pacientes con LDM.

La ASA se ha purificado a partir de diversas fuentes, incluyendo hígado placenta y orina de ser humano. Es una glucoproteína ácida con un punto isoelectrónico bajo. A un pH superior a 6,5, la enzima existe como un monómero con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. La ASA sufre una polimerización dependiente del pH que forma un dímero a pH 4,5. En la orina humana, la enzima consiste en dos subunidades no idénticas de 63 y 54 kDa. La
35 ASA purificada a partir de hígado, placenta y fibroblastos humanos también consiste en dos subunidades de tamaños ligeramente diferentes que varían entre 55 y 64 kDa. Como en el caso de otras enzimas lisosomales, el ASA se sintetiza en los ribosomas unidos a la membrana como un precursor glicosilado. Luego pasa a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, donde sus oligosacáridos ligados a N se procesan con la formación de oligosacáridos fosforilados y sulfatados del tipo complejo (Waheed A et al. Biochim Biophys Acta. 1985, 847, 53-61, Braulke T et al. Biochem Biophys Res Commun. 1987, 143, 178-185). En fibroblastos cultivados normales se produce un polipéptido precursor de 62 kDa, que se transloca a través de la unión del receptor de manosa-6-fosfato (Braulke T et al. J Biol Chem. 1990, 265, 6650-6655) a un endosoma prelisosomal ácido (Kelly BM et al. Eur J Cell Biol. 1989, 48, 71-78).
45

La longitud (18 aminoácidos) del péptido señal de la ASA humana se basa en la secuencia consenso y un sitio de procesamiento específico para una secuencia señal. Por lo tanto, a partir del ADNc de ASA humana deducido (números de acceso en EMBL GenBank J04593 y X521151, véase más adelante), la escisión del péptido señal debería realizarse en todas las células después del residuo número 18 (Ala), dando como resultado la forma madura de la ASA humana. A continuación, la arilsulfatasa A recombinante se abreviará a rASA. La forma madura de la arilsulfatasa A que incluye la forma madura de ASA humana se denominará "mASA" y la ASA humana recombinante madura se denominará "mrhASA".
50

55 Se ha identificado una modificación de proteína en dos sulfatasas eucarióticas (ASA y arilsulfatasa B (ASB)) y una del alga verde *Volvox carteri* (Schmidt B et al. Cell. 1995, 82, 271-278, Selmer T et al. Eur J Biochem. 1996, 238, 341-345). Esta modificación conduce a la conversión de un residuo de cisteína, que se conserva entre las sulfatasas conocidas, en un residuo de ácido 2-amino-3-oxopropiónico (Schmidt B et al. Cell. 1995, 82, 271-278). El novedoso derivado de aminoácido también se reconoce como C_α-formilglicina (FGly). En la ASA y ASB derivadas de células de DMS, el residuo Cys-69 se retiene. En consecuencia, se propone que la conversión de Cys-69 a FGly-69 sea necesaria para generar ASA y ASB catalíticamente activas y que la deficiencia de esta modificación de proteínas sea la causa de la DMS. Cys-69 hace referencia a la ASA precursora que tiene un péptido señal de 18 residuos. En la mASA, el residuo de cisteína mencionado es Cys-51. En investigaciones adicionales se ha demostrado que una
60 secuencia lineal de 16 residuos que rodea a Cys-51 en la mASA es suficiente para dirigir la conversión y que la modificación de la proteína se produce después o en una etapa tardía de la translocación proteica co-traducciona en

el retículo endoplasmático cuando el polipéptido aún no está plegado en su estructura nativa (Dierks T et al. Proc Natl Acad Sci. 1997, 94, 11963–11966, Wittke, D. et al. (2004), Acta Neuropathol. (Berl.), 108, 261–271).

5 Se han demostrado múltiples formas de ASA en electroforesis e isoelectroenfoque de preparaciones enzimáticas a partir de orina, leucocitos, plaquetas, fibroblastos cultivados e hígado. El tratamiento con endoglicosidasa H, sialidasa y fosfatasa alcalina reduce el tamaño molecular y la complejidad del patrón electroforético, lo que sugiere que gran parte de la heterogeneidad de la carga de ASA se debe a variaciones en el contenido de carbohidratos de la enzima.

10 Manifestaciones clínicas de la LDM

El sistema nervioso central consiste en el cerebro y la médula espinal y se puede dividir en sustancia y gris. La sustancia está compuesta por células nerviosas y en la LDM el daño se produce principalmente en las células nerviosas. Cuando las células nerviosas están dañadas, ya no pueden conducir los impulsos nerviosos a los músculos, la piel y los órganos internos.

15 En los casos de LDM, hay un defecto en la actividad de ASA que afecta al metabolismo de la mielina. La falta de esta enzima en pacientes con LDM conduce a la degradación de la mielina y a la disfunción de las células nerviosas. También se observa una acumulación concomitante de tipos especiales de grasa en las células nerviosas en la LDM. Se pueden distinguir tres formas de la enfermedad de acuerdo con las tres formas de la edad de inicio: tardía-infantil, juvenil y adulta (después de los 20 años). El curso de la enfermedad varía en los diferentes tipos. El tipo que se produce en la primera infancia es el más común, progresa más rápidamente y conduce a una discapacidad y muerte pronunciadas.

25 En la forma infantil de la LDM hay varios estadios de la enfermedad. El primer estadio se caracteriza por músculos flojos (hipotonía) de los brazos y las piernas. La marcha se deteriora y el niño necesita apoyo para caminar. El cuadro a menudo se complica con alteraciones del equilibrio (ataxia) y reflejos musculares debilitados. En el segundo estadio, aproximadamente 1-1½ años después del inicio, el niño ya no puede estar de pie, pero todavía puede sentarse. Los músculos flojos previos se vuelven espásticos. La alteración del equilibrio empeora y habitualmente se observa dolor en los brazos y las piernas. La enfermedad progresa al tercer estadio después de 3-6 meses adicionales en los que el niño tiene una parálisis creciente de las cuatro extremidades y ya no puede sentarse. El niño gradualmente necesita ayuda con todo, la visión se ve afectada y los movimientos se vuelven difíciles.

35 El tipo juvenil de LDM comienza entre las edades de cinco y diez años. La progresión es similar al tipo infantil, pero más lenta. Los primeros síntomas de la enfermedad pueden ser labilidad emocional y alteración de la visión. En la forma adulta de LDM, los síntomas aparecen después de los 20 años de edad, tras un desarrollo normal. Los síntomas incluyen anomalías cognitivas y de comportamiento.

40 Incidencia de la LDM

45 En Noruega, cada año nace aproximadamente un niño con LDM, es decir, una frecuencia de aproximadamente 1:50.000. Se han obtenido resultados similares en el norte de Suecia, donde la tasa de incidencia de nacimientos para la LDM infantil tardía en esta población puede calcularse en aproximadamente 1 por 40.000. Solo un paciente con LDM juvenil nació en la región mencionada durante el mismo período. Esto demuestra que la forma juvenil de LDM es mucho más rara que la forma infantil.

Modelo animal de LDM

50 Los ratones defectivos en ASA desarrollan una enfermedad, que corresponde a la LDM (Hess et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 14821–14826, Gieselmann, V. et al. 1989 J. Inherit. Metab. Dis., 21, 564–574, Gieselmann, V. et al. 2003, Acta Paediatr. Suppl. 92, 74–79). Por lo tanto, muestran depósitos de almacenamiento con una distribución y ultraestructura que es prácticamente idéntica a la de los pacientes. Los ratones desarrollan síntomas neurológicos que recuerdan a la enfermedad humana que comprende alteraciones de la marcha, capacidades de coordinación motoras reducidas e hiperactividad (Hess et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 14821–14826, D'Hooge, R. et al. 2001, Brain Res., 907, 35–43, Matzner, U. et al. 2002, Gene Ther., 9, 53–63). Los síntomas aparecen aproximadamente a la edad de un año, pero no reducen la esperanza de vida de los ratones. El fenotipo leve se ha explicado por la falta de desmielinización generalizada (Hess et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 14821–14826, Coenen, R. et al. 2001, Acta Neuropathol. (Berl.), 101, 491–498, Wittke, D. et al. 2004, Acta Neuropathol. (Berl.), 108, 261–271). La desmielinización limitada en ratones se puede atribuir a la corta vida útil, que no permite el desarrollo de disfunciones celulares, causantes de desmielinización. Por lo tanto, los ratones defectivos en ASA representan un modelo animal apropiado, particularmente para investigar intervenciones terapéuticas en un estadio temprana de la enfermedad humana.

65 Diagnóstico existente de LDM

Para diagnosticar la LDM, se puede realizar un análisis del fluido espinal, la orina, diversos análisis de sangre y análisis de la actividad de ASA. Se puede investigar la deficiencia de actividad de ASA en material de pacientes con LDM (por ejemplo, leucocitos periféricos y fibroblastos de piel cultivados). El análisis de la orina de pacientes con LDM puede indicar un defecto en el nivel del metabolismo de la mielina, pero esta es una fuente menos fiable para los ensayos de diagnóstico porque el nivel de la enzima urinaria es normalmente muy variable. Se observan cantidades excesivas de sulfátidos excretados en la orina y gránulos metacromáticos en el sedimento urinario. Además, se pueden llevar a cabo radiografías y tomografías computerizadas (TC) normales de la cabeza. El diagnóstico prenatal parece ser posible al medir la actividad de ASA en células cultivadas a partir de líquido amniótico o células de vellosidades coriónicas. La carga de sulfato de cerebrósido de tales células también puede usarse y es el procedimiento de elección si el gen de pseudodeficiencia también está presente en la familia.

Tratamiento existente de la LDM

Hay relativamente pocas opciones de tratamiento para la LDM. Se ha usado el trasplante de médula ósea (TMO) en el tratamiento de más de 20 pacientes con LDM (por ejemplo, Bayever E et al. *Lancet* 1985, 2, 471–473), y parece que el TMO ralentiza la progresión de los síntomas, pero los beneficios del tratamiento no se ven durante varios meses. En la mayoría de los pacientes infantiles tardíos, los síntomas progresan rápidamente en el momento del diagnóstico y los riesgos del procedimiento tienden a superar los posibles beneficios. En los casos en los que el diagnóstico puede realizarse sin síntomas y hay disponible un donante compatible, el TMO puede ser un enfoque razonable. Además, los resultados notificados sugieren que el TMO es eficaz solo en pacientes con LMD con alta actividad residual o cuando se realiza en estadios presintomáticos en la forma infantil tardía probablemente debido a la rápida progresión de la enfermedad. La perspectiva de utilizar el trasplante de médula ósea está limitada por el hecho de que solo reduce los síntomas en el sistema nervioso central y que se requiere un tratamiento complementario para aliviar los síntomas en el sistema nervioso periférico.

Los modelos de cultivos celulares sugieren que el tratamiento con inhibidores de cisteína proteasa (von Figura K et al. *Am J Hum Genet* 1986, 39, 371–382), tratamiento con tiosulfato (Eto Y et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1982, 106, 429–434), terapia de reemplazo enzimático (Porter *MT Science* 1971, 172 (989), 1263–1265), y terapias de sustitución génica (Sangalli A et al. *Hum Gene Ther* 1998, 9, 2111–2119) podrían ser efectivos. Se han sugerido varios posibles enfoques de terapia génica.

En uno de estos enfoques, se usa una línea celular transducida xenogénica encapsulada en polímero implantada que secreta la enzima ASA. Este enfoque se ha utilizado previamente para el tratamiento de otros trastornos neurológicos, tales como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson. Se sugiere implantar un dispositivo con catéter, que contiene alrededor de 106 células genéticamente modificadas rodeadas por una membrana semipermeable, en el espacio ventricular, lo que proporciona una lenta liberación continua de ASA directamente en el fluido espinal cerebral. Para esta técnica de transferencia génica se usan células mioblastos de ratón C2C12 (Deglon et al. *Hum Gene Ther* 1996, 7, 2135–2146). La membrana semipermeable evita el rechazo inmunológico de las células e interpone una barrera física entre las células y el huésped. Además, el dispositivo y las células se pueden recuperar en caso de efecto secundario debido a la administración de ASA.

En otro enfoque, los genes se administran directamente en el cerebro mediante el uso de adenovirus recombinante (Ohashi et al. *Acta Paediatr Jpn.* 1996, 38, 193–201). Se demostró que el adenovirus recombinante (Adex1SRLacZ) podía transducir los oligodendrocitos de manera muy eficaz. A pesar del hecho de que la terapia génica ha conducido a aumentos satisfactorios en los niveles de enzimas tisulares, el éxito de este enfoque parece limitado, ya que los estudios no han revelado una disminución significativa en los niveles de sulfátidos en respuesta a los niveles enzimáticos incrementados en tejidos importantes como el riñón. Los decepcionantes resultados pueden estar causados por una translocación insuficiente de la arilsulfatasa A a los lisosomas.

El documento WO 2002/098455 describe un proceso para la producción y purificación de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA) así como el uso de rhASA para el tratamiento de la LDM.

La terapia de reemplazo enzimático convencional basada en la infusión sistémica de arilsulfatasa A proporcionaría claramente un tratamiento rentable de la LDM con pocos inconvenientes y bajo riesgo de complicaciones para los pacientes. A diferencia de la terapia génica, la terapia de reemplazo enzimático tampoco plantearía ningún problema ético. Sin embargo, la aplicación de terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de la LDM se ha visto obstaculizada por las dificultades en la preparación de grandes cantidades de arilsulfatasa A con suficiente actividad específica y en la calidad requerida para aplicaciones clínicas. Además, tradicionalmente se considera que la terapia de reemplazo enzimático es eficaz para reducir los niveles de sulfátidos en el sistema nervioso periférico, ya que es poco probable que la arilsulfatasa, debido a su tamaño, acceda al sistema nervioso central.

60 Sumario de la invención

En esencia, el concepto de la invención de la presente invención se basa en el hallazgo de que el aislamiento de arilsulfatasa A recombinante de un sistema de células de mamífero, que se cultiva en un sistema que permite la propagación celular continua, y la purificación mediante una serie de etapas cromatográficas específicas implica un número de ventajas importantes, que incluyen un mayor nivel de expresión y rendimiento de proteína recombinante, así como una mayor pureza de la rASA obtenida. Además, a diferencia de la fermentación discontinua, la producción

en un proceso continuo puede facilitar un control estricto de los parámetros de producción a fin de garantizar un producto de calidad alta y uniforme, incluyendo la modificación postraducciona correcta y la funcionalidad de la enzima resultante. Dicha arilsulfatasa A recombinante purificada es adecuada para su uso en preparaciones farmacéuticas y puede producirse en una forma que sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una formulación de arilsulfatasa A recombinante que comprende una cantidad eficaz de una glicofoma de arilsulfatasa A recombinante que comprende una cantidad de manosa-6-fosfato expuesta que permite la endocitosis eficiente de la arilsulfatasa A recombinante *in vivo* a través de la vía de la manosa-6-fosfato para su uso en la reducción de los niveles de galactosil sulfátido dentro de las células dentro del sistema nervioso central en un sujeto que padece y/o se le ha diagnosticado leucodistrofia metacromática, en el que la formulación no comprende ninguno de los siguientes:

- 15 a) un vehículo para la administración de arilsulfatasa A recombinante en el sistema nervioso central,
- b) un componente capaz de causar la apertura o la interrupción de la barrera hematoencefálica, y
- c) una célula intacta,

en la que la formulación es adecuada para administración sistémica.

20 Otros aspectos de la divulgación proporcionan un proceso para la producción continua de arilsulfatasa A recombinante en un sistema de cultivo celular, comprendiendo el proceso:

- i) cultivar una célula de mamífero capaz de producir rASA en un medio líquido en un sistema que comprende uno o más biorreactores;
- 25 ii) concentrar, purificar y formular la rASA mediante un proceso de purificación que comprende una o más etapas de cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico.

En una realización preferente, el proceso de concentración y purificación de ii) puede comprender las siguientes etapas:

- 30 I) concentrar la rASA presente en el medio líquido por filtración de flujo tangencial;
- II) cargar el sobrenadante que contiene rASA obtenido en la etapa I en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen rASA;
- III) cargar la fracción o fracciones de la etapa II en otra columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen rASA;
- 35 IV) purificar la rASA presente en la fracción o fracciones de la etapa III mediante filtración de flujo tangencial;
- V) pulir la preparación de rASA de la etapa IV en una o dos o más etapas sucesivas, comprendiendo cada etapa cargar la preparación en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen rASA;
- VI) pasar la fracción o fracciones de la etapa V a través de un filtro de reducción viral;
- 40 VII) formular la fracción o fracciones de la etapa VI para obtener una preparación de rASA en un tampón de formulación adecuado;
- VIII) cargar opcionalmente la preparación formulada de rASA en un recipiente adecuado y liofilizar la muestra.

Descripción detallada de la invención

45 El término "enzima" se entiende en el presente documento la enzima relevante que está sustituida tal como está, o una parte enzimáticamente equivalente o análogo de la misma. Un ejemplo de una parte enzimáticamente equivalente de la enzima podría ser un dominio o subsecuencia de la enzima, que incluye el sitio catalítico necesario para permitir que el dominio o subsecuencia ejerza sustancialmente la misma actividad enzimática que la enzima de longitud completa.

Un ejemplo de un análogo enzimáticamente equivalente de la enzima podría ser una proteína de fusión que incluye el sitio catalítico de la enzima en una forma funcional, pero también puede ser una variante homóloga de la enzima derivada de otra especie. Además, las moléculas completamente sintéticas, que imitan la actividad enzimática específica de la enzima relevante, también constituirían "análogos enzimáticos equivalentes".

Un "contaminante" es un material que es diferente del producto polipeptídico deseado. El contaminante puede ser una variante del polipéptido deseado (por ejemplo, una variante desamidada o una variante de aminoaspartato del polipéptido deseado) u otro polipéptido, ácido nucleico, endotoxina, etc.

60 "Purificar" un polipéptido de una composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes significa aumentar el grado de pureza del polipéptido en la composición eliminando (por completo o parcialmente) al menos un contaminante de la composición. Una "etapa de purificación" puede ser parte de un proceso de purificación global que da como resultado una composición que comprende al menos aproximadamente el 20 % en peso del polipéptido de interés, basado en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente el 30 % en peso.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

5 La presente invención se refiere a una estrategia para el tratamiento de la LDM según la cual la arilsulfatasa A recombinante (rASA) se administra a un sujeto, por ejemplo mediante administración sistémica, para alcanzar las células diana relevantes. Aunque básicamente todas las células en el cerebro son deficientes en ASA, los tipos de células de particular interés son los oligodendrocitos u oligodendroglía, que son responsables de la mielinización de las neuronas dentro del sistema nervioso central y las células neuronales. Las células de Schwann, que son responsables de la mielinización del sistema nervioso periférico (SNP), son una de las principales células diana fuera del sistema nervioso central (BHE).

15 Se ha propuesto anteriormente aplicar varias técnicas de administración diferentes de la enzima rASA para facilitar su transporte a través de la BHE y/o las membranas celulares. Ejemplos de tales técnicas se describen brevemente en los siguientes párrafos:

1) Uso de marcadores de manosa-6-fosfato producidos como modificaciones postraduccionales mediante una acción combinada de fosfotransferasas y fosfoglicosidasas en el aparato de Golgi cuando la rASA se expresa en un sistema de células de mamífero. La versión marcada de la enzima tendrá la capacidad de atravesar la membrana celular a través de la captación del receptor de manosa-6-fosfato.

2) Péptidos y proteínas como vehículos para el paso de rASA a las células diana mediante el paso sobre las membranas celulares y/o la BHE:

25 Varios estudios anteriores en animales han demostrado que ciertas proteínas y/o péptidos pueden actuar como vehículos para el paso de la BHE. Por ejemplo, las proteínas modificadas por el fragmento de insulina (Fukuta et al. *Pharmacol Res* 11 : 1681–1688) o anticuerpos frente al receptor de la transferrina (Friden et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4771–4775) puede atravesar la barrera hematoencefálica. Asimismo, se ha notificado que las proteínas modificadas por acoplamiento a poliaminas (Poduslo y Curran. *J Neurochem* 66: 1599–1606) atraviesan la barrera hematoencefálica.

De particular relevancia para la presente divulgación son los dominios disruptores de membrana o transductores de proteínas, en los que el foco se ha puesto en péptidos cortos de 10-30 residuos de longitud. Cuando se unen covalentemente a moléculas de proteínas, estos péptidos pueden transportar la molécula a través de la barrera hematoencefálica y también a través de las membranas celulares en general (Schwarze et al., *Trends Cell Biol.* 2000; 10(7) : 290–295; Lindgren et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; 21(3): 99–103). Una molécula de rASA modificada que contiene tales secuencias peptídicas puede producirse mediante técnicas de expresión. El proceso de transducción de proteínas no es específico del tipo de célula y el mecanismo por el que se produce no se dilucida por completo, sin embargo, se cree que tiene lugar por algún tipo de proceso de penetración y penetración de la membrana que es independiente del receptor. Un estado parcialmente desplegado de la molécula puede facilitar el proceso, pero no es esencial.

Los dominios de transducción de proteínas generalmente derivan de virus u otras moléculas de proteínas no humanas (y tienen el potencial de ser inmunogénicos). Los ejemplos de tales dominios incluyen:

45 el péptido básico de 11 residuos de la proteína TAT del VIH -YGRKKRRQRRR (Schwarze et al., *Trends Cell Biol.* 2000; 10(7): 290-295). Este péptido se une a proteoglicanos de heparán sulfato asociados a la matriz extracelular (HSPG) y transporta una amplia variedad de moléculas grandes y pequeñas a través de las membranas celulares. La entrada inicial puede ser vesicular y la molécula transducida vuelve a salir de la célula cuando la concentración externa disminuye. El péptido puede estar presente en cualquier parte de la molécula siempre que esté expuesto, incluso en el orden inverso al de los residuos de aminoácidos. Todos los seres humanos tienen anticuerpos innatos de título bajo para este dominio básico de TAT que son del isotipo IgM (Schwarze et al., *Trends Cell Biol.* 2000; 10(7): 290-295).

55 Una versión sintética de TAT -YARAAARQARA que confiere más alfa-helicidad y naturaleza anfipática a la secuencia (Ho et al., *Cancer Res.* 2001; 61(2):474–477). Este péptido es considerablemente más eficiente que TAT y también tiene efectos documentados *in vivo*. El péptido no tiene presente ninguna señal de localización nuclear clásica, como es el caso con la secuencia TAT natural, y presenta un epítipo inmunológico diferente.

60 Un péptido líder sintético compuesto de poli-R o una mezcla de residuos básicos -R y -K en combinación con otros aminoácidos.

Los péptidos basados en restos de la secuencia señal hidrofóbicos de la integrina beta-3 o del FGF del sarcoma de Kaposi (Dunican et al. *Biopolymers* 2001; 60(1): 45-60). Estas se denominan secuencias permeables a la membrana y son secuencias hidrofóbicas en lugar de básicas. Derivan de proteínas humanas por lo que su potencial inmunogénico puede ser bajo.

Otros marcadores pueden tener la capacidad de dirigir la enzima a las células diana relevantes mediante el transporte mediado por transportador. Estos marcadores pueden ser un péptido o proteína o la parte funcional de un péptido o proteína que tiene afinidad por un receptor específico. Los ejemplos de tales receptores podrían ser el factor de crecimiento nervioso (NGF) o los receptores del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Una forma de garantizar un transporte de proteínas más eficiente a través de la BHE sería usar sistemas de transporte específicos. Un ejemplo de dicho sistema es el receptor de transferrina, cuyas funciones normales transportan transferrina y melanotransferrina a través de la BHE (Rothenberger et al., Brain Res. 1996, 712, 117–21; Demeule et al., J Neurochem 2002, 83, 924–33). Cuando se une a la rASA, una proteína o péptido sintético de longitud completa con afinidad por el receptor "tirará" DE la rASA modificada sobre la barrera hematoencefálica. Un enfoque alternativo es el uso de la transferencia mediada por receptor de citocinas específicas sobre la barrera hematoencefálica ilustrada por el transporte de TNF-alfa por los receptores p55 y p75 (Pan et al., Exp Neurol. 2002 Apr;174(2):193–200; Pan et al., Arch Physiol Biochem. 2001 Oct; 109(4): 350-353).

3) Toxinas como vehículos para el paso de rASA a las células diana mediante el paso sobre las membranas celulares y/o la BHE:

Diferentes bacterias, plantas y animales producen toxinas. Las toxinas tienen muchas dianas diferentes, tal como el intestino (enterotoxinas), los nervios o las sinapsis (neurotoxinas). Las toxinas pueden atravesar las membranas celulares a través de procesos mediados por el receptor y la realización de la presente divulgación es usar toxinas como vehículos para pasar la rASA a las células diana sobre las membranas celulares y/o la BHE. El uso de toxinas para la administración de productos terapéuticos en el tratamiento de la Leucodistrofia Metacromática (LDM) es de particular relevancia, ya que las células diana preferidas de las toxinas son las células en el sistema nervioso central y/o el sistema nervioso periférico. De consideraciones prácticas y por razones de seguridad, solo se usa el péptido de aminoácido perteneciente a la translocación sobre las membranas celulares y/o la BHE de la toxina.

La toxina diftérica (DT), de la *Corynebacterium Diphtheriae* es un buen ejemplo de una toxina que puede usarse como vehículo. Las toxinas bacterianas exhiben una amplia gama de toxicidades y se dividen en grupos por estructura y función. La toxina se une a una célula diana y entra en la célula a través de un receptor y se reduce a fragmentos separados. La toxina procesada se puede dividir en los siguientes 3 dominios: el dominio catalítico (C), el dominio receptor (R) y el dominio de translocación (T).

Un aspecto principal de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la producción y purificación de arilsulfatasa A recombinante o una parte enzimática equivalente o análogo de la misma, que puede usarse en la prevención o tratamiento de la LDM y/o los síntomas relacionados con este trastorno. El éxito de esta estrategia, sin embargo, depende en gran medida de la disponibilidad de preparados de rASA que tengan una pureza alta y una calidad uniforme. La presente divulgación también proporciona una calidad de rASA que puede actuar como catalizador en el metabolismo intracelular del galactosil sulfátido a galactocerebrósido y, de ese modo, sustituir la ASA deficiente, que es una de las características de la LDM. En una perspectiva adicional, la presente divulgación proporciona una forma recombinante de arilsulfatasa A, que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y también una forma de rASA, que posee marcadores específicos para la entrada en células diana dentro del cerebro. Sin embargo, una realización preferente de la divulgación es la producción y purificación de rASA con un patrón de marcadores de manosa-6-fosfato que permite que la enzima entre en sus células diana mediante la entrada mediada por el receptor de manosa-6-fosfato. En particular, es un objeto de la presente divulgación proporcionar una rASA, que es eficazmente endocitada *in vivo* a través de la vía de la manosa-6-fosfato

La ASA humana madura tiene tres sitios putativos de N-glicosilación, es decir, Asn158, Asn184 y Asn 350, que pueden formar el marcador de manosa-6-P. Asn158, Asn184 y Asn350 se refieren al precursor de ASA que tiene un péptido señal de 18 residuos. En la ASA madura, los residuos de asparagina mencionados son Asn140, Asn166 y Asn332, respectivamente. Solo dos de los sitios de N-glicosilación (Asn140 y Asn332) sufre fosforilación y pueden adquirir el marcador de manosa-6-P correcto y la síntesis de manosa-6-P en estos dos sitios a través de dos etapas enzimáticas distintas.

Las células huésped adecuadas para la expresión del polipéptido glicosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivas de huéspedes tales como Spodopterafrugiperda (oruga), Aedes aegypti (mosquito), Aedes albopictus (mosquito), Drosophila melanogaster (mosca de la fruta) y Bombyx mori. Diversas cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV, y tales virus se pueden usar como virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de Spodopterafrugiperda. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son líneas de CVI de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7); la línea de riñón

embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión); células de riñón de hámster neonato (BHK); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO); células de Sertoli de ratón (TM4); células de riñón de mono (CV I); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células renales caninas (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI; células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

La presente divulgación proporciona un proceso para la producción de rASA en un sistema de cultivo celular continuo, comprendiendo el proceso:

- i) cultivar una célula de mamífero capaz de producir rASA en un medio líquido en un sistema que comprende uno o más biorreactores;
- ii) concentrar, purificar y formular la rASA mediante un proceso de purificación que comprende una o más etapas de cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico.

Más específicamente, el procedimiento de la divulgación comprende la propagación de una línea celular de mamífero capaz de sintetizar rASA en un sistema de cultivo, que permite la propagación celular continua y la posterior extracción y purificación de la rASA resultante en una serie de etapas de cromatografía. Cuando se presenta en un breve resumen, el proceso para la producción y purificación de rASA puede comprender una o más de las siguientes etapas generales:

- A. Cultivo de células de mamífero capaces de producir rASA en un sistema de cultivo celular que permite la propagación celular continua.
- B. Concentración de rASA del sobrenadante y purificación de rASA mediante una serie de etapas de cromatografía en las que las proteínas se separan según su carga neta o afinidad por los ligandos, complementadas con procedimientos de filtración basados en la separación de las proteínas de acuerdo con el tamaño.
- C. Formulación, carga y liofilización.

de rASA en un sistema de cultivo celular que permite la propagación de cultivos celulares durante largos períodos de tiempo.

Es preferente que la célula comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique:

- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa humana recombinante A
- (c) un análogo de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo que comprende una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa humana recombinante A.

En el presente contexto, una secuencia de aminoácidos o una porción de una secuencia de aminoácidos que es un polipéptido capaz de hidrolizar una cantidad del sustrato de arilsulfatasa A pNCS a 37 °C, una velocidad correspondiente a una actividad específica de al menos 20 U/mg de polipéptido (preferentemente 50 U/mg de polipéptido) cuando se determina en un ensayo para medir la actividad de la arilsulfatasa A como se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud y/o un polipéptido, que es capaz de hidrolizar al menos el 40 % de sustrato de la arilsulfatasa A marcado, fx. El palmitoil sulfátido ¹⁴C, cargado en fibroblastos de LDM, cuando se analiza mediante incubación a un nivel de dosis de 25 mU/ml en un ensayo como se describe en el ejemplo 2 de la presente solicitud.

Igualmente preferente en la divulgación es un proceso que incorpora una célula, que comprende

- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- (b) una porción de la secuencia en (a), que codifica una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa humana recombinante A
- (c) un análogo de la secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo que codifica una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A humana recombinante puede preferirse que el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de ácido nucleico comprendida dentro de la célula según la presente divulgación y la SEQ ID NO: 1 sea al menos del 80 %, tal como de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. Igualmente se puede preferir que el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico antes mencionada y la SEQ ID NO: 2 sea al menos del 80 %, tal como de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

Para el fin de la presente invención, la arilsulfatasa A es una enzima recombinante. Particularmente preferente es la arilsulfatasa A recombinante humana (rhASA).

La rASA se produce en una línea de células o células de mamíferos y dicha célula o línea celular de mamífero produce una glicofoma de rASA, que se endocita de manera eficaz *in vivo* a través de la ruta del receptor de manosa-6-fosfato. Específicamente, la glicofoma de rASA comprende una cantidad de manosa-6-fosfato expuesta, lo que permite una endocitosis eficiente de rASA *in vivo* a través de la ruta de la manosa-6-fosfato

5 Se ha contemplado previamente que la expresión de rASA en células CHO, COS y BHK asegura el marcado correcto de manosa-6-fosfato en la molécula, lo que a su vez asegura una captación mediada por receptor eficiente (Stein et al. 3 Biol Chem.1989, 264, 1252–1259). Aunque esto puede ser cierto para la endocitosis *in vitro*, los presentes inventores han observado una endocitosis *in vivo* notablemente aumentada de rASA producida en las
10 células CHO en comparación con la endocitosis *in vivo* de la rASA producida en las células BHK y COS. La endocitosis eficiente de la enzima es un requisito previo para obtener la corrección deseada de los niveles de sulfátido en el sistema nervioso periférico y en los órganos viscerales del cuerpo. Por lo tanto, es preferente que al menos una de las glicofomas producidas de rASA sea similar a una glicofoma producida en las células CHO.

15 Los inventores han observado además que la producción debe optimizarse para garantizar el procesamiento postraduccional correcto de la enzima. En particular, la producción de la enzima a una velocidad e intensidad demasiado altas conduce a un producto de calidad subóptima en términos de glicosilación, fosforilación y formilación. Por lo tanto, es preferente adicionalmente que la producción de arilsulfatasa A o su equivalente se produzca a una velocidad y en las condiciones que den como resultado un producto que comprende una glicofoma
20 de la enzima que tiene cuatro intermedios de la glicosilación según se determina mediante el análisis MALDI-TOF después del tratamiento con bajas concentraciones de PNGasa F. También son preferentes otras condiciones bajo las cuales los restos de carbohidrato adquiridos de la arilsulfatasa A o su equivalente tienen una masa combinada de 3-8 kDa. También es preferible que la producción de arilsulfatasa A o su equivalente se produzca a una velocidad y en condiciones que den como resultado un producto que comprende una glicofoma de la enzima que tiene un patrón de manosa alta y/u oligosacáridos complejos, que están fosforilados para permitir una endocitosis eficiente de
25 la enzima a través de la entrada mediada por el receptor de manosa-6-fosfato.

Como se ha explicado, la modificación postraduccional del residuo de cisteína en la posición 51 en la arilsulfatasa A humana madura es crítica para la actividad de la enzima. Por consiguiente, en una realización preferente de la
30 presente divulgación, la producción de la arilsulfatasa A o su equivalente se produce a una velocidad y en condiciones que dan como resultado un producto que comprende una isoforma de la enzima en la que el aminoácido correspondiente a Cys-69 en la SEQ ID NO: 2 se convierte en formilglicina, que corresponde a Fgly-51 en la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 4 representa arilsulfatasa A humana madura después de la escisión del péptido señal de 18 aminoácidos pero antes de la modificación de C-51.

35 Por tanto, esta realización se refiere a un proceso en el que la arilsulfatasa A producida o su equivalente enzimático se selecciona del grupo que consiste en

- 40 (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
(b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa humana recombinante A
(c) un análogo de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa humana recombinante A.

45 Puede ser preferente que el grado de identidad de secuencia entre la enzima producida de acuerdo con la divulgación y la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4 sea al menos del 80 %, tal como de al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

50 La expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácido nucleico de igual longitud. Si las dos secuencias que se van a comparar no son de la misma longitud, deben alinearse para proporcionar el mejor ajuste posible, lo que permite la inserción de huecos o, como alternativa, el truncamiento en los extremos de las secuencias polipeptídicas o las
55 secuencias de nucleótidos. La identidad de secuencia se puede calcular como $\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$ en la que N_{dif} es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando están alineados y en la que N_{ref} es el número de residuos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia AATCAATC ($N_{dif}= 2$ y $N_{ref}= 8$). Un hueco se cuenta como no identidad del residuo o residuos específicos, es decir, la secuencia de ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia de ADN AGTCAGTC ($N_{dif}= 2$ y $N_{ref}=8$).

60 En todas las realizaciones de la invención basadas en polipéptidos o aminoácidos, el porcentaje de identidad de secuencia entre una o más secuencias se basa en la alineación de las secuencias respectivas realizada por el software clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) usando la configuración predeterminada del programa. Estas configuraciones son las siguientes: Alineación = 3Dfull, Hueco abierto 10.00, Ext del hueco 0,20, distancia de
65 separación del hueco 4, matriz del peso de la proteína: Gonnet. Con respecto a las realizaciones basadas en

nucleótidos de la invención, el porcentaje de identidad de secuencia entre una o más secuencias también se basa en alineaciones usando el software clustalW con configuraciones predeterminadas. Para las alineaciones de la secuencia de nucleótidos, estas configuraciones son: Alineación = 3Dfull, Hueco abierto 10.00, Ext del hueco 0,20, distancia de separación del hueco 4, matriz del peso de ADN 10: identidad (IUB).

5 La actividad biológica y los efectos de la enzima *in vivo* requiere que una cantidad adecuada de la enzima haya adquirido un patrón de glucosilación como se ha descrito anteriormente y se haya modificado postraduccionamente en la posición 51. Por lo tanto, es crucial que al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o el 98 % de la enzima producida es de la glicofoma/isoforma descrita anteriormente.

10 Es preferente que las células de mamífero usadas en el proceso descrito en el presente documento sean de origen humano o de primate. En una realización actualmente más preferente, las células de mamífero son células CHO y, además, es preferente que estas células sean células CHO-DG44. En otra realización preferente, se usa una línea celular humana.

15 En una realización preferente de la presente invención, las células usadas para la producción de rASA comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. En una realización preferente adicional, la rASA está codificada por la SEQ ID NO: 1.

20 En el proceso descrito en el presente documento, la purificación de proteínas se simplifica, ya que en el sistema descrito, la rASA se secreta al medio.

El sistema de cultivo celular se basa en uno o más biorreactores convencionales, que están conectados a una fuente de medio recién preparado y a un sistema en el que se pueden cosechar las células y se puede recolectar el medio.
25 Una parte de este sistema puede ser un dispositivo de retención celular. Preferentemente, estas partes diferentes del sistema están interconectadas de manera que se puede agregar medio nuevo y el medio que contiene células junto con uno o más productos biosintéticos secretados de las células se puede recoger de forma continua. La mASA marcada con manosa-6-fosfato se secreta en el medio y, opcionalmente, la purificación de rASA se facilita mediante el uso de sales de amonio (NH₄Cl) en la etapa de fermentación.

30 Una ventaja inmediata de este sistema en comparación con un sistema discontinuo es permitir una fase de producción efectiva que se extienda durante un tiempo más prolongado. El sistema puede operar continuamente durante un período que se extiende durante una semana, preferentemente dos semanas, más preferentemente 3 semanas, incluso más preferentemente 4 semanas. Las células se pueden propagar a 37 °C, sin embargo, es preferente reducir la temperatura a 33-35 °C cuando se alcanza la meseta de la fase de producción para aumentar la productividad del sistema.

35 En una realización preferente, este sistema se basa en el uso de biorreactores con un volumen de 1 l. Como alternativa, pueden ser preferentes los biorreactores con un volumen de 5 l o los biorreactores capaces de contener aproximadamente 4 l del medio. Sin embargo, como se puede apreciar, el sistema también está previsto como una base para la producción de rASA con una mayor capacidad y, por lo tanto, se ampliará hasta la producción a gran escala, tal como se requiera en la industria farmacéutica. Otras realizaciones preferentes son, por lo tanto, biorreactores o fermentadores con una capacidad de 10 l, más preferentemente 50 l, 200 l, 1.000 l. Actualmente, es preferente un volumen de biorreactor de 100 l, 400 l o 700 l. Además, es preferente que la fase de producción se extienda durante al menos dos semanas y, además, se contempla un proceso en el que se cosechan de 1 a 2 o incluso hasta 4 volúmenes de reactor de cultivo celular cada día.

40 En una realización preferente, el proceso se realiza usando uno o más biorreactores que están equipados con dispositivos de retención de células y bucles de recirculación.

50 La línea celular utilizada para producir el polipéptido usado en la invención se puede cultivar en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F 10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Sigma son adecuados para cultivar las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, de calcio, de magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMICINA), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros suplementos necesarios en concentraciones apropiadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la línea celular seleccionada para la expresión de la enzima, y serán evidentes para el experto en la técnica.

65 Con el fin de controlar los niveles de proteínas indeseadas en el medio de cultivo, es preferente, sin embargo, que el sistema se desarrolle para cultivar las células en un medio libre de suero que solo contenga proteínas humanas recombinantes que tengan pesos moleculares menores de 10 kDa. La concentración de proteína total es de menos

de 10 mg/ml a menos de 100 ug/ml, tal como menos de 1 mg/ml. En una realización preferente, la línea celular se cultiva en medio Excel 302 libre de suero suplementado con factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1).

5 Un material de partida para el proceso de purificación puede ser un extracto de células en bruto, pero, preferentemente, las células secretan rASA y, posteriormente, se purifica del sobrenadante del cultivo celular. El proceso de purificación puede comprender, pero no está limitado a las mismas, las siguientes etapas generales:

- 1) Etapa de concentración y diafiltración,
- 2) Etapa de captura (cromatografía de intercambio iónico),
- 10 3) Etapa intermedia de purificación (cromatografía),
- 4) Filtración ácida
- 5) Pulido (cromatografía),
- 6) Eliminación de virus,
- 7) Formulación,
- 15 8) Carga y liofilización.

Además, se pueden incorporar una o más etapas de intercambio de tampón y, opcionalmente, se pueden omitir la etapa de concentración y diafiltración. Esto es factible, en particular, si el proceso de concentración y purificación de la etapa ii) mencionada anteriormente comprende una o más etapas de cromatografía en lecho expandido. Preferentemente, la etapa de cromatografía de lecho expandido se realiza como la etapa de captura.

Además, es preferente que el proceso de concentración y purificación de (ii) comprenda una etapa de pulido, que incluye una etapa pasiva, en la que la arilsulfatasa A pasa a través de una resina o membrana de cromatografía de afinidad y/o una resina o membrana de cromatografía de cationes, y una etapa activa, en la que la arilsulfatasa A se retiene en el interior y se eluye posteriormente de una membrana o resina de intercambio aniónico. Esta combinación de etapas pasivas y activas se sugiere a partir del hallazgo sorprendente de que mientras que la mayoría de las proteínas contaminantes se unen a una matriz de intercambio aniónico a valores de pH menores que 5,8, preferentemente a valores de pH de 5,5-5,7, la arilsulfatasa A pasará la matriz de intercambio catiónico y posteriormente se unirá a una resina de intercambio aniónico. Se cree que un cambio en la estructura de la enzima de un dímero a un octámero a valores de pH por debajo de 5,8 es responsable de este sorprendente efecto. Este cambio en la estructura tiene relevancia fisiológica, ya que la enzima es activa en los lisosomas a pH bajo.

El proceso de concentración y purificación de la etapa ii) mencionada anteriormente puede comprender las siguientes etapas:

- I) concentrar la rASA presente en el medio líquido por filtración de flujo tangencial;
- II) cargar el sobrenadante que contiene rASA obtenido en la etapa I en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen rASA;
- 40 III) cargar la fracción o fracciones de la etapa II en otra columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen rASA;
- IV) purificar la rASA presente en la fracción o fracciones de la etapa III mediante filtración de flujo tangencial;
- V) pulir la preparación de rASA de la etapa IV en una o dos o más etapas sucesivas, comprendiendo cada etapa cargar la preparación en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen rASA;
- 45 VI) pasar la fracción o fracciones de la etapa V a través de un filtro de reducción viral;
- VII) formular la fracción o fracciones de la etapa VI para obtener una preparación de rhASA en un tampón de formulación adecuado;
- VIII) cargar opcionalmente la preparación formulada de rASA en un recipiente adecuado y liofilizar la muestra.

50 Se contempla que puede no ser necesario realizar todas las etapas generales y específicas del proceso de purificación como se ha descrito anteriormente. Se podría, por ejemplo, omitir la etapa de formulación, así como la carga y la liofilización si el objetivo no es proporcionar un producto final adecuado para uso medicinal.

Como se ha mencionado, la etapa I del proceso descrito anteriormente puede omitirse. Por lo tanto, puede ser preferente que el proceso de concentración y purificación de ii) comprenda las siguientes etapas:

- II) poner en contacto un sobrenadante que contiene arilsulfatasa A en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen arilsulfatasa A;
- 60 III) cargar la fracción o fracciones de la etapa II en otra columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contengan arilsulfatasa A;
- IV) intercambio de tampón de la arilsulfatasa A presente en la fracción o fracciones de la etapa III mediante filtración de flujo tangencial;
- V) pulir la preparación de arilsulfatasa A de la etapa IV en una o dos o más etapas sucesivas, comprendiendo cada etapa cargar la preparación en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contengan arilsulfatasa A;
- 65 VI) pasar la fracción o fracciones de la etapa V a través de un filtro de reducción viral;

VII) formular la fracción fracciones de la etapa VI para obtener una preparación de arilsulfatasa A en un tampón de formulación adecuado;

VIII) cargar opcionalmente la preparación formulada de arilsulfatasa A en un recipiente adecuado y liofilizar la muestra.

5

En la etapa I) del proceso se aumenta la concentración de rASA en el material con el fin de obtener una solución de rASA en un volumen, que es suficientemente pequeño para cargar convenientemente en las columnas de cromatografía de las etapas posteriores del procedimiento de purificación. Preferentemente, la rASA se concentra 5-50 veces en volumen, más preferentemente 10-20 veces por filtración de flujo tangencial. Es obvio para el experto en la técnica que pueden usarse diversas membranas diferentes con diferentes valores de corte de peso nominal. Los valores de corte nominales del peso pueden, por lo tanto, estar en el intervalo de 10 a 100 kDa, sin embargo, en la presente solicitud, es preferente usar una membrana de 30 kDa.

10

Una parte adicional de la etapa I) incluye la diafiltración de la solución que contiene rASA, que se realiza para obtener una solución de rASA en un tampón adecuado como tampón de carga en las etapas de cromatografía posteriores. La diafiltración se lleva a cabo usando un equipo comercialmente disponible y siguiendo un procedimiento estándar bien conocido por los expertos en la técnica.

15

En una realización preferente, la etapa II en este proceso se basa en la cromatografía de intercambio aniónico. Las resinas aniónicas generalmente unen proteínas con una carga neta positiva. Las proteínas con carga negativa o neutras pasarán a través de la matriz y las proteínas con carga positiva (con diversos grados de carga) pueden eluirse de forma discriminada cambiando gradualmente (de forma lineal o por etapas lineales) la carga del contraión del sistema con una sal.

20

Como conocerán los expertos en la técnica, los intercambiadores de iones pueden basarse en diversos materiales con respecto a la matriz, así como a los grupos cargados unidos. Por ejemplo, se pueden usar las siguientes matrices, en las que los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: a base de agarosa (tal como Sepharose CL-6B®, Sepharose Fast Flow® y Sepharose High Performance®), a base de celulosa (tal como DEAE Sephacel®), a base de dextrano (tal como Sephadex®), a base de sílice y a base de polímeros sintéticos. Para la resina de intercambio aniónico, los grupos cargados que están unidos covalentemente a la matriz pueden ser, por ejemplo, dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y/o amonio cuaternario (Q). En una realización preferente del presente proceso, la resina de intercambio aniónico empleada es una columna de DEAE Sepharose y, más específicamente, puede ser una columna de DEAE Sepharose Fast Flow® o de DEAE Streamline, pero se pueden usar otros intercambiadores de aniones.

25

30

35

La resina de intercambio iónico se prepara de acuerdo con procedimientos conocidos. Habitualmente, se pasa un tampón de equilibrado, que permite que la resina se una a sus contraiones, se pasa a través de la resina de intercambio iónico antes de cargar la composición que comprende el polipéptido y uno o más contaminantes sobre la resina. Convenientemente, el tampón de equilibrado es el mismo que el tampón de carga, pero no es necesario.

40

La solución acuosa que comprende rASA y uno o más contaminantes se carga en la resina aniónica usando un tampón de carga que tiene una concentración de sal y/o un pH tal que el polipéptido y el contaminante se unen a la resina de intercambio aniónico. La resina se lava con uno o más volúmenes de columna del tampón de carga, seguido de uno o más volúmenes de columna del tampón de lavado en el que se aumenta la concentración de la sal. Finalmente, la rASA se eluye aumentando aún más la concentración de la sal. Opcionalmente, la elución de la enzima también puede estar mediada por la disminución gradual o por etapas del pH. Las fracciones que contienen actividad de rASA se recogen y se combinan para una purificación adicional.

45

Es evidente para el experto en la técnica que se pueden usar numerosos tampones diferentes en las etapas de carga, lavado y elución. En una realización preferente, se usa un tampón de carga que comprende Tris-HCl 5-100 mM, pH 7,0-8,0, denominado en lo sucesivo "tampón estándar". Como alternativa, se puede usar un tampón de fosfato de sodio, tal como fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5, como tampón estándar durante todo el proceso de purificación, ya que esto inhibirá cualquier fosfatasa residual que pueda escindir los grupos fosfato en la manosa-6-fosfato. La concentración de NaCl se incrementa a 0,05-0,15 M y 0,2-0,4 M durante las etapas de lavado y elución, respectivamente.

50

En una realización opcional, la resina de intercambio iónico se regenera con un tampón de regeneración después de la elución del polipéptido, de modo que la columna puede reutilizarse. En general, la concentración de la sal y/o el pH del tampón de regeneración es/son tales que sustancialmente todos los contaminantes y el polipéptido de interés se eluyen de la resina de intercambio iónico. En general, el tampón de regeneración tiene una concentración de sal muy alta para eluir los contaminantes y polipéptidos de la resina de intercambio iónico.

60

La etapa III en el proceso de purificación comprende una etapa de cromatografía adicional, que es, preferentemente, una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). La HIC utiliza la atracción de una molécula dada por un entorno polar o no polar y, en términos de proteínas, esta propensión se rige por la hidrofobicidad o hidrofiliidad de los residuos en la superficie exterior expuesta de una proteína. Por lo tanto, las proteínas se fraccionan basándose en

65

5 sus diversos grados de atracción a una matriz hidrofóbica, típicamente un soporte inerte con brazos enlazadores de alquilo de 2-18 átomos de carbono en la longitud de la cadena. La fase estacionaria consiste en pequeños grupos no polares (butilo, octilo o fenilo) unidos a una cadena principal polimérica hidrofílica (por ejemplo, sefarosa reticulada, dextrano o agarosa). Por lo tanto, la columna de HIC es, preferentemente, una columna de butilsefarosa o una columna de fenilsefarosa, más preferentemente una columna de butilsefarosa.

10 La carga, el lavado y la elución en la HIC sigue, básicamente, el mismo principio que se ha descrito anteriormente para la cromatografía de intercambio iónico, pero a menudo se aplican condiciones casi opuestas a las usadas en la cromatografía de intercambio iónico. Por tanto, el proceso de HIC implica el uso de un tampón de carga rico en sal, que desenreda la proteína para exponer los sitios hidrofóbicos. La proteína es retenida por los ligandos hidrofóbicos en la columna y se expone a un gradiente de tampones que contienen concentraciones decrecientes de sal. A medida que la concentración de sal disminuye, la proteína vuelve a su conformación nativa y finalmente se eluye de la columna. Como alternativa, las proteínas pueden eluirse con PEG.

15 Es preferente el uso de butilsefarosa y octilsefarosa como fases sólidas en la HIC. De nuevo, es evidente que, cuando se trata de las condiciones exactas, así como de los tampones y combinaciones de tampones utilizados para los procesos de carga, lavado y elución, existe un gran número de posibilidades diferentes. En una realización preferente, la columna se equilibra en el tampón estándar mencionado anteriormente al que se ha añadido Na₂SO₄ 0,25–1 M. El lavado se realiza usando 1–2 lavados de columna de tampón de equilibrado, seguidos de 1–5 volúmenes de columna de NaCl 1,0–3,0 M o acetato de Na 1,8 M en tampón estándar pH 7,5. La rASA se eluye utilizando NaCl 0,25–0,75 M o 1–5 lavados de columna de acetato de Na 0,9 M en tampón estándar a pH 7,5.

25 En una realización preferente adicional, la purificación de la rASA mediante HIC sucede a la purificación por cromatografía de intercambio iónico tal como se realiza en la etapa de captura inicial. Se contempla, sin embargo, que las dos etapas se podrían realizar en el orden inverso, pero esto conducirá presumiblemente a un rendimiento menor.

30 En una realización adicional, la purificación de la muestra en la etapa IV del proceso de purificación se lleva a cabo mediante filtración de flujo tangencial.

35 En la etapa IV del proceso de purificación, la rASA se purifica mediante separación de contaminantes de acuerdo con su tamaño en un entorno ácido mediante filtración de flujo tangencial. La rASA forma un octámero a pH bajo con un peso molecular teórico de 480 kDa y, por lo tanto, será retenida por una membrana relativamente abierta, mientras que la mayoría de los contaminantes pasarán por esta membrana (Sommerlade et al., (1994) *Biochem. J.* 3., 297; 123–130; Schmidt et al., (1995) *Cell*, 82 271–278; Lukatela et al., (1998) *Biochemistry*, 37, 3654–3664). Como el material de partida para este proceso es una suspensión de rASA tal como se ha eluido de la columna de cromatografía en la etapa previa del proceso, el pH en esta suspensión se ajusta a 4–5 mediante la adición de acetato de Na 0,2–1 M a pH 4,5. A continuación se realiza la diafiltración contra 1-10 volúmenes de tampón de acetato de Na a pH 4,0-5,5 de una manera bien conocida por un experto en la técnica. La filtración puede realizarse con la aplicación de varios tipos de filtros diferentes con valores de corte de peso nominal que varían de 20 a 450 kDa, sin embargo, es preferente usar un filtro con un valor de corte que varía de 100 a 300 kDa. Para el procesamiento adicional de la solución que contiene rASA, el pH se ajusta a un valor dentro del intervalo entre 7 y 8 mediante la adición de Tris-base hasta una concentración final de aproximadamente 20–50 mM.

45 Como una alternativa a la filtración de flujo tangencial ácida como se ha descrito anteriormente, la separación de la rASA de los contaminantes se puede obtener con filtración ácida en gel usando esencialmente las mismas condiciones y composiciones de tampones. La filtración se realiza a pH bajo a través de una columna de filtración en gel, que se ha equilibrado con una solución a pH bajo. En el procedimiento actual, una solución 0,2-0,9 M de acetato de Na a pH 4–5. Como una opción, la solución de rASA se concentra mediante filtración de flujo tangencial a través de un filtro de 20–50 kDa antes de la filtración en gel. El grado de concentración puede variar considerablemente de modo que la rASA se puede concentrar desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente hasta aproximadamente 5 mg/ml.

55 En un procedimiento actualmente preferente, el conjunto de muestras de la etapa III se concentra contra un tamiz Biomax A, 30 kDa. La diafiltración se realiza contra 3–5 lavados en columna de acetato de Na 20 mM, a pH 5,4–5,7. El más preferente es un proceso en el que la filtración de flujo tangencial se produce contra un tamiz Biomax A.

60 Existen varias opciones para la etapa de pulido (etapa V en el proceso de purificación). Esta etapa puede implicar la purificación usando cromatografía de intercambio iónico esencialmente como se ha descrito anteriormente. Por conveniencia, la muestra se carga en el tampón desde la etapa anterior del proceso de purificación. En otra realización, se puede usar cromatografía en una columna de hidroxapatita cerámica.

65 La hidroxapatita (HAP) generalmente se refiere a la forma cristalina del fosfato de calcio. El mecanismo de HAP implica interacciones inespecíficas entre los grupos carboxilo de la proteína cargados negativamente y los iones de calcio cargados positivamente en la resina, y los grupos amino de la proteína con cargados positivamente y los iones de fosfato cargados negativamente en la resina. Las proteínas básicas o ácidas se pueden adsorber selectivamente

- en la columna ajustando el pH del tampón; la elución se puede lograr variando la concentración de sal del tampón. De nuevo, es evidente que se pueden emplear numerosas composiciones del tampón, así como combinaciones de tampones. Preferentemente, sin embargo, la columna se equilibra con 1–10 lavados en columna de un tampón que comprende Tris–HCl 1–100 mM a pH 7,0–8,0. Por conveniencia, la muestra se carga en el tampón desde la etapa anterior del proceso de purificación. La columna se lava con 1–10 volúmenes de columna del tampón utilizado para el equilibrio y la muestra se eluye en una mezcla de este tampón y un tampón que comprende fosfato de sodio 100–800 mM. Opcionalmente, la columna se reconstituye lavando con 1–10 volúmenes de columna de fosfato de sodio 100–800 mM.
- En las etapas de cromatografía, el volumen apropiado de resina utilizado cuando se empaqueta en una columna de cromatografía se refleja por las dimensiones de la columna, es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina, y varía dependiendo de, por ejemplo, la cantidad de proteína en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina utilizada. Sin embargo, la escala del proceso de producción, así como del proceso de purificación, pueden aumentarse para obtener la producción y purificación de rASA a escala industrial. Por consiguiente, se pueden aumentar parámetros tales como el tamaño de la columna, el diámetro y la velocidad de flujo para cumplir con la velocidad y la eficiencia de dicha producción a gran escala. Mientras que las columnas con un diámetro que varía de 50 a 100 mm, volúmenes en el tamaño de 100–300 ml y caudales entre 40 y 400 cm/hora o de 5 a 100 ml.
- En una versión actualmente preferente, el procedimiento de la etapa V se basa en las características de la rASA de la siguiente manera: Teórica y prácticamente, la rASA tiene un punto isoeléctrico que se encuentra en las proximidades de pH 6,0. Esto significa que la proteína debe unirse a un intercambiador de aniones a un pH mayor que 6,5 y a un intercambiador de cationes a un pH inferior a 5,5. Los presentes inventores han confirmado tal unión a un intercambiador de cationes experimentalmente, donde se encuentra que, en principio, no se une rASA a un pH de 5,6. Aproximadamente el 50 % de toda la rASA se une a un pH de 5,2 y el 100 % se une a un pH de 4,8. Para el intercambiador de aniones, sin embargo, la rASA se une a cualquier valor de pH probado dentro del intervalo de 7,2 a 4,8. En principio, parece que la rASA se une a los intercambiadores de aniones con carga positiva a un pH de 4,8, en los que la propia enzima también debería estar cargada positivamente. En las mismas condiciones, la enzima se une igualmente bien a un intercambiador de cationes. Se supone que estas características de unión inesperadas son el resultado de que la enzima está extremadamente polarizada y tiene un lado fuerte "cargado positivamente" y un lado fuerte "cargado negativamente". Como alternativa, las características de unión pueden explicarse por el cambio de la enzima de un dímero a un octámero a valores de pH por debajo de 5,8.
- El procedimiento actualmente preferente de la etapa 5 aprovecha estas características inesperadas. La etapa de pulido se inicia así a pH 6,0 al que la enzima no se unirá a una primera resina de cromatografía de afinidad o a un primer intercambiador de cationes (etapa pasiva). Sin embargo, esta etapa elimina muchas de las proteínas de las células huésped contaminantes. Para una preparación que se utilizará en una preparación farmacéutica, la cantidad de tales proteínas debe ser mínima.
- Después del paso a través de la resina de afinidad o catiónica, la rASA se unirá a una resina de intercambio aniónico posterior, que se puede acoplar a la resina catiónica en serie. Si las dos resinas están acopladas, la resina de intercambio catiónico se desacopla posteriormente y el intercambiador de aniones se lava a un pH de aproximadamente 4,8, dejando la rASA unida a la resina. El hecho de que la rASA permanezca unida a la resina a pH 4,8 es altamente inesperado y se contempla que esta capacidad solo será compartida por muy pocas proteínas, ya que, efectivamente, deberían tener un punto isoeléctrico por debajo de 4,2.
- Por consiguiente, en una realización preferente, las dos o más etapas sucesivas en la etapa V del proceso de purificación comprenden una etapa pasiva, en la que la rASA pasa a través de una resina o membrana de cromatografía catiónica, y una etapa activa, en la que la rASA se retiene dentro y posteriormente se eluye de una membrana o resina de intercambio aniónico. La membrana o resina de intercambio aniónico puede ser un intercambiador aniónico de alta resolución.
- Adicionalmente, se puede preferir adicionalmente que la membrana o resina de cromatografía catiónica y dicha membrana o resina de intercambio aniónico estén acopladas o conectadas en serie. En el presente contexto, la expresión "acoplado o conectado en serie", cuando se usa en relación con la cromatografía de afinidad o catiónica y la cromatografía de intercambio iónico de aniones significa que las proteínas que pasan a través de la resina de cromatografía de afinidad o catiónica se cargan directamente en la resina de intercambio aniónico sin cambio de tampón u otras condiciones.
- En una realización preferente, la membrana o resina de cromatografía catiónica es una membrana Mustang™ S, una resina S-Sepharose o una resina Blue Sepharose y dicha membrana o resina de intercambio aniónico es una membrana Mustang™ Q o Source™ Q.
- En una realización específica, las columnas se equilibran con más de 10 volúmenes de columna de acetato de Na 20–100 mM, a pH 4,5–8,5, preferentemente acetato de sodio 20–100 mM, a pH 5,5–7,7. El conjunto de muestras de la etapa 4 se carga en las columnas y, después del paso de la rASA a través de la columna de intercambio catiónico,

las dos columnas se desacoplan y el intercambiador aniónico se lava con 2-4 volúmenes de columna de acetato de Na 50-75 mM a pH 4,8. El intercambiador aniónico se equilibra con más de 10 volúmenes de columna de Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 (tampón estándar). La columna se lava con NaCl 0,1 mM en tampón estándar y la rASA se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,3 M en tampón estándar.

5 En una realización actualmente preferente, las resinas aniónicas y/o catiónicas se lavan con 2-4 lavados en columna de acetato de sodio 20-70 mM a pH 4,8. 31. Es igualmente preferente que la membrana o resina de intercambio aniónico se equilibre con al menos 11 lavados de columna de fosfato sódico 10 mM a pH 7,5 y, posteriormente, se lave con NaCl 60 mM en fosfato sódico 10 mM a pH 7,5. Por último, actualmente es preferente que la arilsulfatasa A se eluya de la resina de intercambio aniónico con un gradiente lineal de NaCl 60-500 mM en fosfato de sodio 10 mM, a pH 7,5

15 En el proceso de purificación se incorporan adicionalmente una o más etapas de inactivación de virus o filtración de virus. Se entiende que estos procedimientos están destinados a dar lugar a una preparación de una enzima, que está sustancialmente libre de virus infecciosos y que se puede denominar "producto seguro contra virus". Además, se contempla que los diversos procedimientos se puedan usar independientemente o en combinación. Preferentemente, la filtración del virus se realiza después de la purificación de la enzima mediante varias etapas de cromatografía. En una realización preferente, la etapa de filtración del virus se realiza mediante el paso de la solución que contiene rASA que es un resultado de la etapa 5 del proceso de purificación a través de un filtro estéril y el paso posterior de la solución filtrada estéril a través de un nanofiltro. Por "filtro estéril" se entiende un filtro, que eliminará sustancialmente todos los microorganismos capaces de propagarse y/o causar infección. Si bien es preferente que el filtro tenga un tamaño de poro de 0,1 micrómetros, el tamaño de poro podría oscilar entre 0,05 y 0,3 micrómetros.

25 Además de, o como una alternativa a la filtración de virus, la inactivación de virus se puede lograr mediante la adición de uno o más "agentes inactivadores de virus" a una solución que comprende la enzima. Preferentemente, la etapa de inactivación de virus se realizará antes del proceso de purificación para asegurar que el agente no esté presente en el producto final en ninguna cantidad o concentración que comprometa la seguridad del producto cuando se usa como producto farmacéutico o cuando el producto se utiliza para la preparación de un producto farmacéutico. La expresión "agente inactivador de virus" pretende designar dicho agente o procedimiento, que puede usarse para inactivar virus con envoltura lipídica, así como virus con envoltura no lipídica. La expresión "agente inactivador de virus" se debe entender que abarca tanto una combinación de dichos agentes y/o procedimientos, siempre que sea apropiado, así como también un solo tipo de dicho agente o procedimiento.

35 Puede ser factible reemplazar o combinar la filtración de virus de la muestra como se realiza en la etapa VI del proceso de purificación con el contacto de la muestra con un detergente, preferentemente antes de la etapa V o preferentemente antes de la etapa II del proceso de purificación.

40 Los agentes inactivadores de virus preferentes son detergentes y/o disolventes, más preferentemente mezclas de detergente-disolvente. Debe entenderse que el agente inactivador de virus es, opcionalmente, una mezcla de uno o más detergentes con uno o más disolventes. Se puede usar una gran variedad de detergentes y disolventes para la inactivación de virus. El detergente se puede seleccionar del grupo que consiste en detergentes no iónicos e iónicos y se selecciona de modo que sea sustancialmente no desnaturalizante. Preferentemente, se usa un detergente no iónico, ya que facilita la posterior eliminación del detergente de la preparación de rASA en las etapas de purificación posteriores. Se describen detergentes adecuados, por ejemplo, en Shanbrom et al., en la patente de Estados Unidos 4.314.997 y la patente de Estados Unidos 4.315.919. Los detergentes preferentes son los vendidos como las marcas comerciales Triton X-100 y Tween 20 o Tween 80. Los disolventes preferentes para usar en agentes inactivadores de virus son dialquifosfatos o trialkilfosfatos como se describe, por ejemplo, en Neurath y Horowitz en la patente de Estados Unidos 4.764.369. Un disolvente preferente es tri(n-butil)fosfato (TNBP). Un agente inactivador de virus especialmente preferente para la práctica de la presente invención es Tween 20, pero, como alternativa, se pueden usar otros agentes o combinaciones de agentes. El agente preferente se añadió en un volumen tal que la concentración de Tween-20 en la solución que contiene rASA está dentro del intervalo de 0,5-4,0 % en peso, preferentemente a una concentración de aproximadamente 1 % en peso.

55 La etapa de inactivación de virus se lleva a cabo en condiciones para la inactivación de virus con envoltura, lo que da como resultado una solución que contiene rASA sustancialmente segura sin virus. En general, tales condiciones incluyen una temperatura de 4-37 °C, tal como 19-28 °C, 23-27 °C, preferentemente aproximadamente 25 °C, y un tiempo de incubación que en los estudios de validación se descubrió que es eficaz. En general, es suficiente un tiempo de incubación de 1-24 horas, preferentemente de 10-18 horas, tal como de aproximadamente 14 horas, para asegurar una inactivación suficiente del virus. Sin embargo, las condiciones apropiadas (temperatura y tiempos de incubación) dependen del agente inactivador de virus empleado, el pH y la concentración de proteína y el contenido de lípidos de la solución.

65 Se contempla que también se pueden emplear otros procedimientos para eliminar o inactivar virus para producir un producto seguro contra virus, tal como la adición de azul de metileno con posterior inactivación por radiación con luz ultravioleta.

En una realización preferente, el proceso divulgado en el presente documento da como resultado un producto o formulación que comprende una cantidad relativa de arilsulfatasa A recombinante bioactiva, en particular arilsulfatasa A humana recombinante que es al menos 90 %, tal como al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %
5 %, al menos 99 %, al menos 99,5 %, o al menos 99,9 % de la cantidad total de proteínas en el producto o formulación, como se determina mediante HPLC de fase inversa.

Se puede preparar una formulación terapéutica que comprende el polipéptido opcionalmente conjugado con una molécula heteróloga, mezclando el polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecidimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio: fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, PLURONICST o polietilenglicol (PEG).

Los ingredientes activos también incluirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli (metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la variante polipeptídica, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y y-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico.

El polipéptido purificado como se divulga en el presente documento o la composición que comprende el polipéptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable se usa a continuación para diversos usos de diagnóstico, terapéuticos u otros conocidos para tales polipéptidos y composiciones. Por ejemplo, el polipéptido puede usarse para tratar un trastorno en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido al mamífero.

En una realización específica de la invención, la rASA se formula en una solución isotónica tal como 0,9 % de NaCl y fosfato sódico 10-50 mM, a pH 6,5-8,0 o fosfato sódico, glicina, manitol o las sales de potasio correspondientes. En otra realización, la rASA se formula en un tampón fisiológico, tal como:

- a) tampón de formulación I que contiene (en mM): Na₂HPO₄ (3,50 – 3,90), NaH₂PO₄ (0 – 0,5), glicina (25 – 30), manitol (230 – 270) y agua para inyectables; o
- b) tampón de formulación II que contiene (en mM): Tris-HCl (10), glicina (25-30), manitol (230-270) y agua para inyectables.

En una realización adicional, la rASA se formula como vesículas lipídicas que comprenden galactósido y/o fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina.

Una realización adicional de la divulgación es un proceso en el que la rASA se formula como una formulación de liberación sostenida que implica microesferas biodegradables, tales como microesferas que comprenden ácido poliláctico, ácido poliglicólico o mezclas de estos.

Se puede desear adicionalmente formular la rASA con una solución hipertónica para provocar la apertura osmótica de la barrera hematoencefálica y también formular la rASA se formula en una solución que comprende un potenciador para la administración nasal.

Se contempla una realización específica, en la que la rASA se formula de manera que mejore su semivida en el torrente sanguíneo y/o reduzca la eliminación a través de los riñones y/o evite la absorción prolongada a través del hígado.

5 Finalmente, el proceso divulgado en el presente documento puede dar como resultado la producción, purificación y formulación de una proteína, que es enzimáticamente equivalente a rASA. Esta enzima puede ser diferente en términos de su estructura de la rASA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. Puede ser una ventaja que la secuencia de residuos de aminoácidos que rodea a Cys-51 sea idéntica o tenga un alto grado de identidad de secuencia con la correspondiente secuencia en la SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, puede preferirse que una secuencia lineal de 20
10 aminoácidos, tal como 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 residuos de aminoácidos que rodean a Cys-51 en la arilsulfatasa A son idénticos o al menos idénticos en un 90 %, tal como un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a la secuencia correspondiente en la SEQ ID NO: 3. Como la forma activa de la rASA dentro de los lisosomas es un octámero, un objeto adicional de la divulgación es proporcionar una rASA que es un octámero o se ensambla en un octámero en condiciones fisiológicas.

15 En el presente documento se divulgan adicionalmente procedimientos analíticos para analizar la eficacia de cada etapa de purificación, así como la calidad de las preparaciones resultantes de rASA con respecto a, por ejemplo, la actividad enzimática, la concentración de proteína total y de rASA, la pureza y los niveles de endotoxina.

20 La actividad enzimática, que debe entenderse como la actividad catalítica de la rASA, puede medirse en un ensayo enzimático basado en la hidrólisis mediada por rASA de un sustrato detectable o un sustrato, lo que conduce a un producto final detectable. En un aspecto preferente, el ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato cromogénico sintético, sulfato de para-nitrocatecol (pNCS) que tiene un producto final, para-nitrocatecol (pNC) que absorbe la luz a 515 nm.

25 La concentración de proteína total en las muestras en proceso y los productos finales se puede determinar mediante un ensayo comercialmente disponible que utiliza los principios de la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por proteínas en un medio alcalino (la reacción de Biuret). Este procedimiento es bien conocido por un experto en la técnica.

30 La concentración de rASA en muestras recogidas después de varias etapas del proceso de purificación puede evaluarse en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima rASA (ELISA). La determinación cuantitativa de una proteína mediante ELISA es una técnica convencional conocida por el experto en la técnica. Sin embargo, la presente divulgación también proporciona un ELISA específico para la detección de rASA basada en capturar la enzima con inmunoglobulinas policlonales específicas y, posteriormente, detectar la enzima capturada con anticuerpos monoclonales específicos.

35 La pureza y la identidad de las diversas preparaciones de rASA pueden determinarse por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como rHPLC, SDS-PAGE y transferencia de tipo Western rASA. Además, la cantidad de proteínas celulares completas (HCP) en las preparaciones de rASA se puede determinar mediante el uso de ELISA así como técnicas de transferencia de tipo Western usando anticuerpos disponibles comercialmente. Preferentemente, todos los procesos mencionados anteriormente están adaptados para realizarse en placas de microtitulación por conveniencia.

45 En comparación con la fermentación discontinua, el proceso de fermentación continua descrito en el presente documento permite un control estricto de los parámetros del proceso para proporcionar preparaciones y formulaciones de la enzima que son de una alta calidad uniforme. Las características del producto enzimático divulgado en el presente documento, así como la formulación que comprende el producto enzimático y su aplicabilidad en la prevención o el tratamiento de la LDM depende de forma crucial del proceso de producción y purificación descrito anteriormente. Otro aspecto principal de la presente invención se refiere, por lo tanto, a una
50 formulación de arilsulfatasa A para su uso de acuerdo con la invención, que se puede obtener o se obtiene mediante un proceso como el descrito anteriormente.

Aunque se ha sugerido el uso de diversos adyuvantes, incluidos vehículos para la administración celular y agentes de permeación de membrana, para mejorar la eficacia terapéutica de la arilsulfatasa A en la terapia de reemplazo enzimático, los experimentos *in vivo* han demostrado, sorprendentemente, que la preparación o formulación enzimática de acuerdo con el presente la invención es altamente eficiente cuando se usa sin tales adjuntos. Por consiguiente, la formulación de arilsulfatasa A no comprende ninguno de los siguientes:

- 60 a) un vehículo, tal como un péptido o polipéptido, para la administración de la enzima (arilsulfatasa A) al sistema nervioso central, y
- b) un componente capaz de causar la apertura o la interrupción de la barrera hematoencefálica, y
- c) una célula intacta.

65 Se mencionan varios vehículos en secciones previas de la presente descripción, incluyendo péptidos tales como el fragmento de insulina, péptidos y proteínas derivadas de virus o bacterias, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos frente al receptor de transferrina y toxinas. Además, en la técnica se ha sugerido el uso de

células intactas que incluyen una célula transducida, por ejemplo una célula autóloga transducida, tal como un fibroblasto transducido o un linfocito de sangre periférica. En particular, se ha sugerido la implantación de líneas celulares encapsuladas en polímero que secretan arilsulfatasa A en el líquido cefalorraquídeo. Además, se sabe que varios agentes o sustancias químicas, tales como, por ejemplo, tiosulfato, causan una interrupción temporal de la barrera hematoencefálica. Una arilsulfatasa A o una formulación de arilsulfatasa A de acuerdo con la presente divulgación puede, por supuesto, combinarse con tales vehículos, agentes, sustancias químicas o sistemas celulares. Como se ha mencionado anteriormente, también se ha sugerido la formulación de arilsulfatasa A en una solución hipertónica para mejorar la accesibilidad del sistema nervioso central. Sin embargo, en una realización preferente, se descarta el uso de cualquiera o de todos los vehículos, agentes, sustancias químicas, formulaciones o sistemas celulares conocidos en relación con la preparación enzimática de la presente divulgación.

Además, la posibilidad de administrar preparaciones enzimáticas directamente a través de la barrera hematoencefálica, tal como por inyección espinal o intratecal, se ha tratado en la técnica anterior. Sin embargo, la formulación de arilsulfatasa A para su uso de acuerdo con la presente invención es para administración sistémica, tal como para administración intravenosa.

El producto de arilsulfatasa A y la formulación que comprende arilsulfatasa A descrita en el presente documento tienen como una de sus características un contenido muy bajo de proteínas de células huésped. En un producto o formulación prevista como una composición farmacéutica o un producto destinado a usar en la preparación de una composición farmacéutica, el contenido de tales proteínas es crucial, ya que se espera que tengan efectos inmunogénicos. En una realización preferente, el producto o formulación final contiene menos del 1,5 % de proteínas celulares completas, tal como menos del 1 %, por ejemplo menos del 0,75 %, o menos del 0,5 %, o menos del 0,25 % de proteínas celulares completas. El producto o formulación puede contener adicionalmente impurezas en forma de variantes enzimáticamente inactivas del componente principal. En una realización preferente, el producto o formulación contiene al menos un 90 % de rASA enzimáticamente activa, tal como un 92 % o 94 %. En una realización aún más preferente, la cantidad relativa de rASA enzimáticamente activa es al menos el 95 %, tal como el 96 % o el 97 % o incluso el 98 % o el 99 % según se determina mediante HPLC de fase inversa.

Además del proceso divulgado en el presente documento, es un objetivo de la invención proporcionar una formulación o una composición farmacéutica que comprenda rASA, que se endocita eficazmente a través de la ruta del receptor de manosa-6-fosfato I. Cuando se aplica a endocitosis de rASA, el término "eficientemente" se refiere a endocitosis que conduce a un aumento de al menos 100 veces en la concentración de rASA dentro de las células del riñón, el plexo braquial y el nervio isquiático en ratones con LDM ocho días después de la inyección intravenosa de una dosis única de rASA (40 mg/kg).

De acuerdo con la eficiencia descrita del proceso de purificación es preferente que esta formulación o composición comprenda al menos un 98 % de rASA bioactiva según se determina mediante HPLC de fase inversa. Una característica adicional de la enzima o formulación preparada de acuerdo con el proceso descrito en el presente documento es su alto nivel de actividad específica. Por lo tanto, es preferente que la formulación o composición farmacéutica comprenda una rASA con una actividad específica de al menos 10 U/mg, al menos 20 U/mg, al menos 25 U/mg, al menos 30 U/mg, al menos 40 U/mg, al menos 50 U/mg, al menos 60 U/mg, al menos 70 U/mg, al menos 75 U/mg, al menos 80 U/mg, al menos 85 U/mg, al menos 90 U/mg, al menos 100 U/mg, al menos 150 U/mg, al menos 200 U/mg al menos 250 U/mg o al menos 300 U/mg de proteína.

También se describe en el presente documento una arilsulfatasa A o una formulación que comprende una cantidad eficaz de arilsulfatasa A, para uso como medicamento. La rASA puede tener cualquiera de las características descritas anteriormente y, por lo tanto, es preferente que la arilsulfatasa A o la formulación se pueda obtener o se obtiene realmente mediante un proceso divulgado en el presente documento. Específicamente, es un objeto de la invención proporcionar una rASA para su uso como medicamento para reducir los niveles de esfingolípido 3-O-sulfogalactosilceramida (galactosil sulfátido) dentro de las células del sistema nervioso central en un sujeto que padece y/o es diagnosticado con leucodistrofia metacromática.

De acuerdo con las divulgaciones en la presente solicitud, la administración de esta rASA conducirá a una disminución del deterioro de las habilidades de aprendizaje motor y/o a una mayor velocidad de conducción del nervio motor y/o amplitud de la conducción nerviosa.

Según una publicación reciente, la inyección intratecal, que se inyecta directamente en el líquido cefalorraquídeo) de la alfa-L-iduronidasa humana recombinante (rhIDU) puede reducir el almacenamiento de carbohidratos en el tejido cerebral en un modelo canino de mucopolisacaridosis (MPL) (Kakkis, 2003). Sobre la base de estas observaciones, la presente divulgación proporciona procedimientos de tratamiento que comprenden:

- (a) administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación por vía intravenosa para obtener una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en células diana dentro del sistema nervioso periférico, opcionalmente como un complemento al tratamiento mediante trasplante de médula ósea; y/o

- (b) administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación por vía intravenosa con el fin de obtener una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en las células diana dentro del sistema nervioso tanto periférico como central; y/o
- 5 (c) administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación por vía intravenosa para obtener una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en células diana dentro del sistema nervioso periférico, opcionalmente en combinación con inyección intratecal de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación para obtener una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en las células diana dentro del sistema nervioso central.
- 10 Por consiguiente, el procedimiento puede comprender administrar dicha composición farmacéutica por vía intravenosa y por inyección espinal y obtener así una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en las células diana dentro del sistema nervioso periférico y en las células diana dentro del sistema nervioso central en dicho sujeto.
- 15 Según una realización preferente adicional de la invención, el procedimiento comprende administrar dicha composición farmacéutica por vía intravenosa a dicho sujeto y obtener así una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en las células diana dentro del sistema nervioso periférico y en las células diana dentro del sistema nervioso central en dicho sujeto.
- 20 La rASA también puede ser endocitado eficientemente *in vivo* en las células diana dentro de un tejido seleccionado del grupo que comprende hígado, riñón, bazo, corazón.
- Como el destinatario experto sabrá, dichas células diana dentro del sistema nervioso central son, preferentemente, oligodendroglía, y dichas células diana dentro del sistema nervioso periférico son, preferentemente, células de Schwann.
- 25 Se contempla que la naturaleza exacta de los planes de tratamiento basados en el procedimiento según la presente divulgación dependerá de factores tales como la edad, el sexo y el estadio de la enfermedad del sujeto que se va a tratar, y que el régimen de dosificación óptimo y la frecuencia de administración pueden, con ventaja, determinarse sobre una base empírica. Sin embargo, en una realización preferente de la invención, dicha composición farmacéutica se administra en una o más dosis, comprendiendo cada dosis una cantidad de rASA que está dentro del intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal, tal como dentro del intervalo de 0,25 a 50, de 1 a 25, de 1 a 10 o de 1 a 5 mg/kg de peso corporal.
- 30 También se puede preferir que la composición farmacéutica se administre diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente.
- De acuerdo con la descripción anterior, la inyección intravenosa de dicha composición farmacéutica se puede realizar como un suplemento al trasplante de médula ósea.
- 40 Si bien se ha sugerido el tratamiento de reemplazo enzimático como un enfoque para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la acumulación lisosómica de galactosil sulfátido, se ha aceptado como un hecho que los efectos terapéuticos de la terapia de reemplazo enzimático convencional basados en la administración sistémica de la enzima se limitarían al sistema nervioso periférico. Un aspecto interesante de la presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que la administración de una formulación que contiene arilsulfatasa A, cuando se repite de manera regular, causa una reducción en los niveles de lípidos almacenados, no solo en el sistema nervioso periférico, sino también en el sistema nervioso central. Por lo tanto, la divulgación también proporciona el uso de una formulación que comprende una cantidad eficaz de arilsulfatasa A para la fabricación de un medicamento para reducir los niveles de galactosil sulfátido en células dentro del sistema nervioso central en un sujeto que padece y/o se le ha diagnosticado leucodistrofia metacromática. Por lo tanto, el procedimiento descrito en el presente documento puede conducir a una reducción en los niveles de galactosil sulfátido en células diana dentro del sistema nervioso central creadas total o parcialmente por un efecto de lavado causado por la eliminación de sulfátidos en tejidos y en sangre. Los sulfátidos se eliminan del cerebro en parte debido al gradiente de concentración resultante de la eliminación de sulfátidos en el tejido y en la sangre.
- 45 De acuerdo con el hecho de que solo se observan aumentos insignificantes en los niveles de enzimas en las células del cerebro, los efectos terapéuticos en el SNC son el resultado principalmente del mantenimiento de niveles efectivos de enzima en la circulación o en los órganos viscerales como consecuencia de la administración sistémica de una cantidad de la enzima. Por lo tanto, la cantidad efectiva de arilsulfatasa A es tal que:
- 50 a) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en la circulación durante no menos de 8 días, y/o
- b) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en los órganos viscerales, el nervio ciático y el plexo braquial durante no menos de 8 días, y/o
- 55 c) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en el hígado durante no menos de 8 días, después de la administración sistémica y, preferentemente, intravenosa de dicha formulación.
- 60
- 65

Como los efectos observados después de la administración de arilsulfatasa A parecen transitorios, se desvela que la cantidad efectiva de arilsulfatasa A debe ser tal que:

- 5 a) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en la circulación, y/o
 b) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en los órganos viscerales, el nervio ciático y el plexo braquial, y/o
 c) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en el hígado y/o el riñón
 mediante la administración intravenosa repetida de la formulación semanal, quincenal o mensual. En el presente contexto, la expresión "niveles efectivos" debe entenderse como los niveles de arilsulfatasa A, que son efectivos para causar al menos una reducción del 10 % del esfingolípidico 3-O-sulfogalactosilceramida (galactosil sulfátido) almacenado en las células dentro de los órganos viscerales, incluyendo el riñón, según lo determinado por TLC 8 días después de la administración intravenosa de arilsulfatasa A en una cantidad de 40 mg/kg de peso corporal. Se puede preferir que la reducción de galactosil sulfátido sea de al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 % o al menos el 40 % con respecto a los niveles presentes antes de la administración de la enzima. Además, se puede preferir que la arilsulfatasa A se administre en una cantidad de entre 5 y 100 mg de enzima por kg de peso corporal, tal como 10 mg/kg de peso corporal, 20 mg/kg de peso corporal, 30 mg/kg de peso corporal, 50 mg/kg de peso corporal, 60 mg/kg de peso corporal, 70 mg/kg de peso corporal 80 mg/kg de peso corporal o 90 mg/kg de peso corporal. Como es probable que los efectos en el SNC dependan críticamente de la calidad de la enzima, es preferente que la formulación de arilsulfatasa A sea una formulación como se ha descrito anteriormente.

Además, es importante que la enzima tenga una alta actividad específica y es preferente que la arilsulfatasa A tenga una actividad específica de al menos 20 U/mg, tal como al menos 30 U/mg, al menos 40 U/mg, al menos 50 U/mg, al menos 60 U/mg, al menos 70 U/mg, al menos 80 U/mg o al menos 90 U/mg.

El uso de adyuvantes, tales como compuestos o formulaciones con una capacidad conocida para facilitar la administración de macromoléculas al sistema nervioso central, no parece ser necesario para obtener el efecto observado en el sistema nervioso central. Por lo tanto, el medicamento no comprende ninguno de los siguientes componentes:

- 30 1. a) un vehículo, tal como un péptido o polipéptido, para la administración de la enzima (arilsulfatasa A) al sistema nervioso central, y
 2. b) un componente capaz de causar la apertura o la interrupción de la barrera hematoencefálica, y
 3. c) una célula intacta, que incluye una célula transducida, tal como una célula autóloga transducida, tal como fibroblastos transducidos o linfocitos de sangre periférica.

35 4. También es evidente que el tratamiento suplementario con cualquiera de los agentes o componentes mencionados anteriormente puede ser innecesario. Por lo tanto, es preferente que el medicamento sea para la administración a un sujeto que no reciba ningún tratamiento médico adicional para la reducción de los niveles de esfingolípidico 3-O-sulfogalactosilceramida, que incluye:

- 40 a) la administración de una formulación que comprende un vehículo, tal como un péptido o polipéptido o anticuerpo, para la administración de la enzima (arilsulfatasa A) en el sistema nervioso central, y
 b) la administración de una formulación capaz de causar la apertura o interrupción de la barrera hematoencefálica, y
 45 c) la administración de una célula intacta, incluyendo una célula transducida, tal como una célula autóloga transducida, tal como fibroblastos o linfocitos de sangre periférica transducidos.

Aún otro aspecto más de la presente divulgación es un procedimiento para tratar a un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho sujeto una composición farmacéutica que comprende una rASA, que puede tener cualquiera de las características descritas anteriormente, y obtener así una reducción de los niveles de galactosil sulfátido en las células diana dentro de dicho sujeto.

Este aspecto de la presente divulgación se refiere, por tanto, a un procedimiento para tratar/aliviar un síntoma de un trastorno asociado con un almacenamiento lisosómico aumentado del esfingolípidico 3-O-sulfogalactosilceramida (leucodistrofia metacromática), comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto una formulación de arilsulfatasa A obtenida u obtenible mediante un proceso de acuerdo con la invención y obteniendo de este modo una reducción de los niveles de galactosil sulfátidos en las células dentro de dicho sujeto. Debe entenderse que las células, que son el objetivo de este procedimiento de tratamiento, pueden ser o pueden incluir células dentro del sistema nervioso central. El trastorno puede ser leucodistrofia metacromática (LDM) o deficiencia múltiple de sulfatasa (DMS).

Como se ha mencionado, es preferente que la administración del medicamento, que es la formulación de la arilsulfatasa A, no comprenda la invasión mecánica, química o biológica del sistema nervioso central. Estos términos comprenden la administración directa del medicamento a través de la barrera hematoencefálica, así como el uso de adyuvantes y/o formulaciones con una capacidad conocida de facilitar la administración de macromoléculas a través de la barrera hematoencefálica.

5 Por consiguiente, el procedimiento terapéutico descrito en el presente documento comprende, preferentemente, administrar la formulación de arilsulfatasa A por una vía diferente a la administración intracerebroventricular, espinal, intratecal o intracraneal, tal como una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración intravenosa, intraarterial, oral, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraparenquimatosa, mucosa, nasal y rectal.

10 Lo más importante, debe reconocerse que el procedimiento terapéutico de acuerdo con la presente divulgación proporciona un enfoque eficiente para el tratamiento de la leucodistrofia metacromática. Por lo tanto, en una realización preferente, el sujeto que recibe tratamiento terapéutico, que incluye la administración de una formulación de arilsulfatasa A, es un sujeto que no recibe ninguno de los siguientes tratamientos previos, concomitante o después de la administración de dicha formulación de arilsulfatasa A:

- 15 a) administración de una formulación de arilsulfatasa A por vía seleccionada de un grupo que consiste en administración intracerebroventricular, espinal, intratecal o intracraneal,
- b) administración de un vehículo para la administración de la enzima al sistema nervioso central,
- c) trasplante de médula ósea o de células madre de médula ósea,
- d) administración de células que expresan arilsulfatasa A endógena y/o exógena,
- 20 e) administración de un medicamento capaz de provocar la apertura o la interrupción de la barrera hematoencefálica, por ejemplo tiosulfato sódico, o una solución hipertónica capaz de aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica,
- f) administración sistémica o intratecal de células intactas, incluyendo una célula transducida, tal como una célula autóloga transducida, tal como fibroblastos o linfocitos de sangre periférica transducidos,
- g) terapia génica.

25 La distribución topográfica del almacenamiento de sulfátidos lisosomales en el sistema nervioso central de ratones deficientes en arilsulfatasa A se describe con detalle en Wittke, D. et al. 2004, Acta Neuropathol 108, 261–271. En el presente contexto, se observa una reducción en el almacenamiento de sulfátido dentro del sistema nervioso central, en particular en los fagocitos, incluyendo células microgliales activadas, neuronas y oligodendroglía. La reducción de los niveles de sulfátido dentro del sistema nervioso central se observa principalmente en las células localizadas dentro de la sustancia blanca o gris dentro de cualquiera de las siguientes regiones: médula espinal, tronco encefálico, cerebelo, núcleos del prosencéfalo y corteza cerebral.

30 Además de la reducción de los niveles de sulfátido en las células dentro del sistema nervioso central como se ha descrito anteriormente, se observa una reducción correspondiente dentro del sistema nervioso periférico, en particular en las células de Schwann.

35 En una realización adicional de la presente divulgación, la composición farmacéutica comprende además una solución hipertónica o se administra junto con una solución hipertónica para provocar la apertura osmótica de la barrera hematoencefálica.

40 La capacidad de la rASA para entrar en una célula diana sobre la membrana celular mientras se mantienen sus propiedades catalíticas se puede determinar *in vitro* usando cultivos de células que contienen un sustrato adecuado para la enzima según lo descrito por Kudoh y Wenger. J. Clin. Invest. 1982. 70 (1): 89–97. El ejemplo 2 del presente texto proporciona un ejemplo de dicho sistema modelo y muestra los resultados de la prueba para una preparación de rASA obtenida mediante el proceso descrito.

45 Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación incluye un sistema modelo que comprende un cultivo de células de mamífero en el que puede determinarse la degradación de sulfátidos por ASA exógena. En un aspecto preferente de esta realización, estas células son fibroblastos derivados de un paciente con LDM y, por consiguiente, carecen de ASA funcional endógena. Sin embargo, es fácilmente evidente que otras células que se caracterizan por una actividad de ASA deficiente y la capacidad de acumular un sustrato detectable de ASA pueden formar la base de tal ensayo, a continuación, células genéticamente modificadas para reducir o abolir la expresión y/o la función de ASA. En otro aspecto preferente de esta realización, los sulfátidos usados como sustrato en este sistema se marcan mediante la adición de un compuesto radiactivo o no radiactivo para la detección posterior. En un aspecto más preferente, el sustrato de la rASA es palmitoil sulfátido y, en un aspecto igualmente preferente, el sustrato está marcado con ¹⁴C.

50 Una realización adicional de la presente divulgación es una preparación de rASA, que es capaz de reducir el contenido celular de uno o más de sus sustratos cuando se analiza en el sistema descrito anteriormente. Preferentemente, la enzima se añadirá al medio de cultivo a una concentración que varía de 0 a 100 mU/ml y conducirá a una reducción en los niveles de sustrato intracelular que corresponde, preferentemente, al 20 %, más preferentemente al 30 %, aún más preferentemente al 40 %, aún más preferentemente al 50 %, aún más preferentemente al 60 %, de la forma más preferente a más del 70 %.

65 Un aspecto final de la presente divulgación proporciona un sistema de cultivo celular continuo como se describe para el proceso de acuerdo con la presente divulgación.

Con respecto a la descripción anterior de los diversos aspectos de la presente invención y de las realizaciones específicas de estos aspectos, debe entenderse que cualquier rasgo y característica descritos o mencionados anteriormente en relación con un aspecto y/o una realización de un aspecto de la invención también se aplica por analogía a cualquiera o todos los otros aspectos y/o realizaciones de la invención descrita.

Cuando se hace referencia a un objeto de acuerdo con la presente invención o uno de sus rasgos o características en singular, también hace referencia al objeto o sus rasgos o características en plural. Como un ejemplo, cuando se hace referencia a "una celda" debe entenderse que se refiere a una o más células.

A lo largo de la presente especificación, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

El siguiente texto proporciona un ejemplo de producción de rASA mediante propagación celular continua en el sistema de cultivo y purificación del producto de acuerdo con las etapas 1 a 5 del procedimiento de purificación como se ha descrito anteriormente (ejemplos 1 y 2). La actividad biológica de la rASA purificada se evalúa en un sistema *in vitro* como se ha descrito anteriormente. Además, los efectos de administrar rASA de acuerdo con la presente invención *in vivo* se evalúan en una serie de experimentos realizados en ratones ASA (-/-) (defectivos), también denominados ratones LDM. Los resultados de estos experimentos *in vitro* e *in vivo* se proporcionan en los ejemplos 3 a 6.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

Figura 1: (A) Representación esquemática del sistema para la propagación celular continua. (B) Esquema del proceso de purificación.

Figura 2: Prueba discontinua de cromatografía de intercambio iónico de rhASA.

Figura 3: (A) HPLC-cromatograma de rhASA después de la finalización de la etapa (V) del procedimiento de purificación según la presente divulgación. (B) Ampliación del cromatograma de HPLC de (A).

Figura 4: Aclaramiento de sulfátido en fibroblastos de LDM cargados con sulfátido radiomarcado después de la incubación con rhASA durante 24 horas.

Figura 5: Aclaramiento de sulfátido en fibroblastos de LDM cargados con sulfátido radiomarcado después de la incubación con rhASA durante 6, 24 y 48 horas.

Figura 6: niveles séricos de rhASA 10 minutos después de la inyección intravenosa de rhASA

Figura 7: Análisis *in vitro* de CHO-rhASA. (A) SDS-PAGE de enzima nativa (-) y desglucosilada (+). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Las masas de los patrones de proteína (pat) están indicadas. El tratamiento con PNGasa F causa un desplazamiento de la banda de ASA debido a la pérdida de carbohidratos ligados a N. (B) Endocitosis dependiente de M6P de CHO-rhASA por las células BHK analizada mediante ELISA. Las células BHK se incubaron con 1 µg de CHO-rhASA por ml de medio durante 20 horas en presencia o ausencia de M6P 10 mM. Otras placas se suplementaron con glucosa 6-fosfato (G6P) 10 mM como control. El bloque completo de endocitosis por M6P indica que las células BHK internalizan CHO-rhASA a través de los receptores M6P. Esto indica la presencia de residuos de M6P en CHO-rhASA. Los datos se expresan como medias ± SD, n = 3.

Figura 8: (A) Análisis MALDI-TOF. La rhASA aislada de las secreciones de células CHO muestra un tamaño correcto de 57 kDa y la preparación enzimática carece de contaminantes importantes. El pico menor a 29 kDa (ASA/2) representa la molécula doblemente cargada. (B) Análisis MALDI-TOF de CHO-rhASA tratado con una concentración baja de PNGasa F. La desglucosilación limitada produce cuatro productos. Supuestamente representan rhASA que tiene tres, dos, uno o ningún N-glucano. Por lo tanto, el patrón de masa sugiere que los tres sitios potenciales de N-glicosilación de CHO-rhASA están glicosilados.

Figura 9. Farmacocinética de CHO-rhASA después de una única inyección en la vena de la cola de los ratones con deficiencia de ASA. Todos los datos se expresan como las medias ± SD. (A) Niveles de rhASA en plasma en la primera hora después de la inyección de 20 mg/kg (círculos cerrados, n = 9) o 40 mg/kg (círculos abiertos, n = 11). La concentración se determinó mediante ELISA. (B) Niveles de rhASA en el hígado en diversos momentos después de la administración de 40 mg/kg. La concentración se determinó mediante ELISA (n = 3). (C) Cinética tisular de rhASA después de la administración de 40 mg/kg en riñón (barras abiertas), nervio ciático (barras sombreadas) y cerebro (barras cerradas) según lo determinado mediante ELISA (n = 3). nd– no determinado.

Figura 10: Farmacocinética de CHO-rhASA después de una única inyección en la vena de la cola de los ratones con deficiencia de ASA. Todos los datos se expresan como las medias ± SD. (A) Niveles tisulares de rhASA 8 días después de la inyección de diferentes dosis de enzimas (n = 5). La concentración se determinó mediante ELISA para riñón (barras abiertas), plexo braquial (barras cerradas) y nervio ciático (barras sombreadas). Los tejidos de ratones de tipo salvaje no tratados y ratones defectivos en ASA tratados de forma simulada se analizaron como controles negativos. Los homogeneizados de control del nervio ciático muestran alguna señal de fondo inespecífica, ya que los tiempos de incubación tuvieron que prolongarse para cuantificar la inmunorreactividad específica en las muestras nerviosas muy pequeñas de ratones tratados. (B) Distribución relativa del tejido de rhASA 8 días después de la inyección de 20 mg/kg. La concentración de rhASA se midió mediante ELISA y se normalizó en el nivel en el hígado (n = 3).

Figura 11: Aclaramiento de sulfátido de los tejidos después del tratamiento individual de ratones con deficiencia de ASA con CHO-rhASA. Los niveles de sulfátido (barras cerradas), colesterol (barras abiertas) y esfingomielina (barras sombreadas) se determinaron mediante TLC y se expresan como las medias de unidades arbitrarias \pm SD. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa para los controles tratados de manera simulada (prueba t de Student, $p < 0,05$). (A) Análisis de lípidos renales mediante TLC. Los lípidos se extrajeron de los riñones de diferentes grupos experimentales y se incubaron en condiciones alcalinas para hidrolizar fosfoglicerolípidos y ésteres de colesterol. Los productos de reacción se separaron mediante TLC, se visualizaron y se analizaron mediante densitometría. Los volúmenes de carga se normalizaron sobre la concentración de proteína del homogeneizado de tejido crudo utilizado para la extracción de lípidos. Se cargaron cantidades crecientes de colesterol (col), sulfátido (sulf) y esfingomielina (sm) como patrones. (B) Niveles de lípidos en el riñón en diferentes momentos después de la inyección de 40 mg/kg ($n = 3$). (C) Niveles de lípidos en el riñón 8 días después de la inyección de diferentes dosis de enzimas ($n = 5$).

Figura 12: Aclaramiento de sulfátido de los tejidos después del tratamiento individual de ratones con deficiencia de ASA con CHO-rhASA. Los niveles de sulfátido (barras cerradas), colesterol (barras abiertas) y esfingomielina (barras sombreadas) se determinaron mediante TLC y se expresan como las medias de unidades arbitrarias \pm SD. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa para los controles tratados de manera simulada (prueba t de Student, $p < 0,05$). (A) Niveles de lípidos en el cerebro a diferentes tiempos después de la inyección de 40 mg/kg ($n = 3$). (B) Niveles de lípidos en el nervio ciático 8 días después de la inyección de diferentes dosis de enzima ($n = 5$). (C) Niveles de lípidos en el plexo braquial 8 días después de la inyección de diferentes dosis de enzima ($n = 5$).

Figura 13. Niveles de lípidos en (A) riñón (B) cerebro, (C) nervio ciático y (D) plexo braquial después de la administración repetida de 20 mg de CHO-rhASA/kg una vez a la semana. Los ratones defectivos se trataron con hasta cuatro infusiones de CHO-rhASA. Los controles se trataron de manera simulada con cuatro inyecciones de tampón. Los niveles de sulfátido (barras cerradas), colesterol (barras abiertas) y esfingomielina (barras sombreadas) se analizaron 8 días después de la última administración y se expresan como las medias \pm SD ($n = 3$). Los asteriscos indican una diferencia significativa en el nivel de sulfátido en comparación con los controles tratados de forma simulada (prueba t de Student, $p < 0,05$).

Figura 14. Almacenamiento de sulfátido en el SNC como se ha demostrado histoquímicamente mediante incubación con azul alcian (véase Procedimientos). Secciones gruesas de la corona (100 μ m) a través del tronco encefálico de un ratón defectivo en ASA tratado de forma simulada (A, C, E, G) y un ratón defectivo en ASA tratado con la enzima (B, D, F, H). (A, B) Esquema para delinear las regiones que se muestran a mayor aumento en las microfotografías siguientes. 7n-raíz del nervio facial, CbN-núcleo cerebeloso, icp-pedúnculo cerebeloso inferior, PnC-núcleo reticular pontino, VC-núcleo coclear ventral, Ve- núcleo vestibular. (C, D) Núcleo del abdúccens (6N) y regiones adyacentes. 7g-genu del nervio facial. En el ratón tratado de manera simulada se observa material alcianofílico (sulfátido) en muchas células, de las cuales se pueden identificar los fagocitos y las neuronas (marcados con triángulos y círculos, respectivamente, en el recuadro). En el ratón tratado con rhASA, el material alcianofílico se observa principalmente en las neuronas. (E, G) y (F, H) Pedúnculo cerebeloso inferior (icp) como ejemplo de un tracto de sustancia blanca. En el ratón tratado de forma simulada se observan numerosos fagocitos alcianofílicos grandes, de los cuales solo unos pocos se encuentran en el foco óptico en G (algunos están marcados por círculos). Los pequeños gránulos alcianofílicos pueden estar asociados a oligodendrocitos que, sin embargo, no pueden identificarse a este aumento. En el ratón tratado con rhASA, el icp muestra solo pequeñas estructuras alcianofílicas que sugieren que los fagocitos que almacenan sulfátido disminuyen en tamaño y/o número. La tinción general de los núcleos cerebelosos y vestibulares en F se reduce, ya que la alcianofilia está restringida principalmente a las neuronas y ha desaparecido en gran medida de los fagocitos. Barras: 500 μ m en A y B; 100 μ m en C y D; 200 μ m en E y F; 10 μ m en G, H y recuadros de C y D.

Figura 15. Almacenamiento de sulfátido en el riñón como se ha demostrado histoquímicamente mediante la incubación de láminas de 100 μ m con azul alcian (véase Procedimientos). (A) Ratón de tipo silvestre; se observa una tinción débil en la banda interna de la médula externa (iS-oM), mientras que la banda externa de la médula externa (oS-oM) y la corteza (C) no están teñidas. (B, C) Ratón defectivo en ASA tratado de forma simulada. Se observa almacenamiento intenso de sulfátido (material alcianofílico) en los túbulos de la banda interna de la médula externa; en la banda externa y la corteza, varios perfiles muestran el almacenamiento de sulfátido. (D, E) Ratón defectivo en ASA tratado con cuatro dosis de 20 mg de CHO-rhASA/kg. La corteza está desprovista de material alcianofílico. En la banda externa, la tinción se reduce. En la banda interna, la tinción parece no cambiar en comparación con el animal tratado de manera simulada. Las barras representan 500 μ m en A, B, D y 200 μ m en C, E. (F-J) Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. (F, H) Ratón defectivo en ASA tratado de forma simulada, miembro ascendente grueso (TAL) en la banda externa y los túbulos contorneados distales (DCT) en la corteza. Las inclusiones citoplásmicas intensamente teñidas corresponden a los lisosomas llenos de sulfátido, como se ha mostrado previamente (Lullmann-Rauch, R. et al., Histochem. Cell Biol., 116, 161-169). (G, I) Ratón defectivo en ASA tratado con cuatro dosis de 20 mg de CHO-rhASA/kg, segmentos representativos de la nefrona correspondientes a los de F y H. El material de almacenamiento se reduce en la TAL y está ausente de los perfiles de DCT. G- glomérulo, PT- túbulo proximal. La barra representa 20 μ m en F-J.

Figura 16. Efectos funcionales de la administración repetida con 20 mg de CHO-rhASA/kg una vez a la semana. (A) Parámetros neurofisiológicos determinados en ratones de tipo silvestre (barras cerradas), ratones defectivos en ASA tratados de forma simulada (barras abiertas) y ratones defectivos en ASA 6 días después de la cuarta inyección de CHO-rhASA (barras sombreadas). Los parámetros indicados se midieron en la musculatura intrínseca del pie después de la estimulación distal del nervio ciático. Los datos se expresan como las medias \pm

SD (n = 7–8). Los asteriscos indican una diferencia significativa (prueba t de Student, p <0,05). (B) Rendimiento en el cilindro giratorio de los ratones a una media de edad de alrededor de 9 meses (9,2 ± 1,1 meses). Se analizaron los ratones defectivos en ASA (triángulos cerrados, n = 7) los días 2 y 3 después del tercer tratamiento con 20 mg de CHO-rhASA/kg. Los ratones de tipo silvestre de edad equivalente (círculos, n = 10) y los ratones defectivos en ASA tratados de forma simulada (triángulos abiertos, n = 10) se analizaron como controles en paralelo. Los porcentajes de ratones que fueron capaces de mantener el equilibrio sobre una barra que gira lentamente durante al menos 4 minutos se determinaron en cuatro ensayos consecutivos. (C) Rendimiento en el cilindro giratorio de los ratones a una media de edad de alrededor de 12 meses (11,8 ± 1,1 meses). También en este experimento, los ratones tratados se analizaron los días 2 y 3 después de la tercera inyección de 20 mg de CHO-rhASA/kg. Leyenda y tamaños de los grupos como en B, excepto n = 14 para los ratones defectivos tratados con rhASA.

Figura 17: Presentación de parámetros electrofisiológicos de estudios sobre la conductividad del motor nervioso. (Corresponde en parte al panel (A) de la figura 16).

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Propagación celular continua

Se desarrolla un sistema de propagación celular continua y un proceso de purificación de tamaño pequeño o mediano para rhASA en una escala de columna de 200–400 ml destinada a la producción a escala-gran escala (escala de la columna > 2 l). En la figura 1 se proporciona una representación esquemática del sistema. La calidad y la pureza del producto final (rhASA) es muy alta y adecuada para pruebas toxicológicas (incluidos las etapas 1-4 + 7) y, finalmente, también es adecuada para los ensayos clínicos (incluidas todas las etapas descritas). Como se ha descrito anteriormente, el proceso incluirá una etapa de captura, 1-2 etapas de purificación intermedias, 1 etapa de pulido, 1-2 etapas de eliminación de virus y 1 etapa de formulación. También se incluirán 1 o más etapas de intercambio de tampón.

Diseño experimental: Se prueban varios geles de cromatografía diferentes y se analiza el rendimiento de las diferentes etapas (con respecto a la eliminación de los contaminantes, el rendimiento y la pureza) con una batería de procedimientos analíticos que se describen brevemente a continuación.

Procedimientos analíticos

Actividad enzimática: Ensayo de arilsulfatasa
Concentración de proteína total: Análisis de BCA
Concentración de rhASA: ELISA de rhASA
Pureza: rPHPLC, SDS-PAGE
Identidad rPHPLC, Transferencia de tipo Western rhASA
 HCP-ELISA, Transferencia de tipo Western Proteínas HCP
Nivel de endotoxina De acuerdo con el método 2.6.14 de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) Para la administración i.v., el valor aceptable es de 5 UI/kg/h. Con una dosis máxima de 1 mg/kg/y una concentración del producto de 5 mg/ml, el límite es de 25 UI/ml.
Osmolalidad: De acuerdo con el método 2.2.35 de la Ph. Eur. Dado que en la Farmacopea Europea no se establece un valor aceptable para este producto exacto, el valor (250-350 mOsmol/kg) se define porque se compara con una solución isotónica de NaCl (0,9 %), que es bien tolerado *in vivo*.
Contenido de ADN: Umbral de ADN
pH: De acuerdo con el método 2.2.35 de la Ph. Eur. Dado que no se establece un valor aceptable en la Farmacopea Europea para este producto exacto. El valor (7,0–8,0) se define porque es un pH neutro y bien tolerado *in vivo*.
Recuento bacteriano: Se usará el método 2.6.12 (filtración en membrana) de la Ph. Eur. para analizar el IPA y la sustancia a granel. No existe un valor aceptable establecido en la Farmacopea Europea para este producto exacto. El valor (≤ 10 ufc/ml) se define para garantizar una carga biológica mínima adecuada antes de la esterilización. El producto final para la administración i.v. será estéril y se analizará de acuerdo con el método 2.6.1 de la Ph. Eur.

60 Descripción de los procedimientos analíticos

Ensayo de la arilsulfatasa

65

Además de sus sustratos naturales, la ASA también puede catalizar la hidrólisis del sustrato cromogénico sintético, sulfato de para-nitrocatecol (pNCS), véase la figura. El producto, para-nitrocatecol (pNC), absorbe la luz a 515 nm. El método se describe en Fluharty et al. 1978, Meth. Enzymol. 50:537-47

5 Materiales y equipamiento

Espectrofotómetro Spectra MAX Plus de Molecular Devices o equivalente.
Cubeta de 1 ml (vidrio o plástico) con 1 cm de longitud de recorrido adecuada para 515 nm.
Placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano.

10

Sustancias químicas y reactivos

pNCS– sulfato de p-nitrocatecol (n. ° N-7251, Sigma)

BSA– Seroalbúmina bovina Frac. V

15

NaAc– acetato de sodio trihidrato

Triton X–100

Tris-HCl de calidad de biología molecular

PBS, pH 7,4 sin Ca^{2+} , Mg^{2+} : 0,20 g/l de KCl, 0,20 g/l de KH_2PO_4 , 8 g/l de NaCl,

1,15 g/l de Na_2HPO_4 . Ajustar el pH.

20

Todos los demás disolventes y sustancias químicas fueron de calidad para p.a. (Merck)

a. 2X solución de sustrato de ASA: pNCS 30 mM, 10 % (p/v) de NaCl y 1 mg/ml de BSA en NaAc 0,5 M a pH 5,0.

b. TBS, pH 7,5: Tris-HCl 10 mM y NaCl 150 mM en H_2O .

c. Solución de cese de la reacción: NaOH 1 M

25

Como muchos aniones y cationes, tales como SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SO_3^{2-} , F^- , Ag^+ , Cu^{2+} y Hg^{2+} , son inhibidores de la enzima en concentraciones en el intervalo milimolar o inferior, la muestra se transfiere a un tampón adecuado (por ejemplo, TBS) antes de medir la actividad. Esto se realiza mediante diálisis o intercambio de tampón en una columna de filtración en gel (por ejemplo, PD10 de Amersham Pharmacia Biotech).

30

a. Medición de la actividad de ASA en los sobrenadantes celulares

El medio usado se centrifuga (110 x g, 5 minutos) y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio. El tampón se cambia a TBS mediante diálisis o usando una columna de filtración en gel.

35

b. Medición de la actividad de ASA intracelular

Las células en suspensión se lavan una vez con PBS y, a continuación, una vez con TBS antes de que se lisen en 0,5 ml de TBS + 0,5 % de TritonX-100 durante 10 minutos, T.A. Después de agitar en vórtex, se centrifugan los lisados (13.200 rpm, 10 minutos) y los sobrenadantes se recogen en tubos limpios.

40

Como alternativa, las células se resuspenden en TBS y luego se lisan mediante ciclos repetidos de congelación-descongelación.

c. Medición de la actividad de ASA en muestras en proceso y en el producto final

45

El tampón se cambia a TBS antes de que se mida la actividad y se determina la concentración de proteína en las muestras usando el kit de reactivo de ensayo de proteína BCA (véase a continuación).

Para asegurar la linealidad, se busca una absorbancia final entre 0,1 y 2 (véase la referencia 2). Las muestras se diluyen en TBS si es necesario.

50

a. A una placa de microtitulación se añaden 50 μl de diluyente de muestra (TBS o TBS + TritonX–100) al menos en duplicados y se usan como blancos.

b. A la placa de microtitulación se añaden 50 μl de muestras o muestras diluidas por duplicado.

c. A cada pocillo se añaden 50 μl de solución de sustrato 2X ASA. La placa se sella y se incuba a 37 °C +/- 0,5 °C durante exactamente 30 minutos.

55

d. La reacción se detiene mediante la adición de 50 μl de solución de cese de la reacción (NaOH 1 M) en todos los pocillos.

e. La lectura previa se realiza utilizando una placa de microtitulación llena con 0,15 ml de agua MilliQ/pocillo para corregir los efectos de dispersión. Posteriormente, se mide la absorbancia a 515 nm en 30 minutos utilizando un lector de placas. La absorbancia medida de la placa de microtitulación a una longitud de recorrido de 1 cm mediante el uso de una aplicación llamada Path Check.

60

f. La absorbancia delta (ΔA) se calcula restando el valor de la absorbancia del blanco de la absorbancia medida de cada una de las muestras. El coeficiente de extinción molar (ϵM) para el producto pNC es 12 400 M⁻¹ cm⁻¹.

Cálculos

65

Definición: Una unidad (1 U) de actividad enzimática se define como la hidrólisis de 1 μmol de pNCS por minuto a 37 $^{\circ}\text{C}$, a pH 5,0.

La siguiente ecuación se usa para calcular la actividad de la enzima en μmol de pNCS hidrolizado/min x ml (= Unidades/ml):

$$\frac{V_{\text{tot}} \text{ (ml)} \times \Delta A}{\epsilon_M / 1000 \times V_{\text{muestra}} \text{ (ml)} \times \text{tiempo de incubación (min)}} = \text{Unidades/ml (1)}$$

en la que:

- ΔA = absorbancia de la muestra–absorbancia del blanco
- V_{tot} (ml) = volumen de reacción total en ml (en este caso, 0,15 ml)
- V_{muestra} (ml) = volumen de muestra añadido en ml (en este caso, 0,05 ml)
- ϵ_M = el coeficiente de extinción molar para el producto pNC, que en este caso es $12\,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La ecuación 1 podría escribirse más simplificada como:

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

Para calcular la actividad específica en μmol de pNC consumido/(minuto x mg) (= Unidades/mg), divida la ecuación 1 con la concentración de proteína de la muestra:

$$\text{Ec. 1 / Conc. de proteína (mg/ml)} = Y \mu\text{mol} / (\text{minuto} \times \text{mg}) = \text{Unidades/mg (2)}$$

Análisis de BCA

Se usa un kit de ensayo disponible comercialmente (kit de ensayo Pierce BCA Protein, n.º 23225) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ELISA de rhASA para la determinación de las concentraciones de rhASA

El procedimiento es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa de la arilsulfatasa humana recombinante (rhASA) en soluciones, tales como tampones, medio de cultivo celular y suero. La rhASA se captura en placas de 96 pocillos maxisorp revestidas con la fracción IgG del antisuero de conejo para la rhASA purificada por afinidad. La rhASA capturada se detecta con un anticuerpo monoclonal contra rhASA, seguido de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con peroxidasa de rábano picante (HRP). La HRP convertirá el sustrato tetrametilbencidina (TMB) en un producto de color azul, que se vuelve amarillo al acidificarse. La absorbancia se mide a 450 nm y se usa una curva estándar a partir de concentraciones conocidas de rhASA para calcular las concentraciones de rhASA de las muestras.

Equipo

Espectrofotómetro para placas, es decir, Spectramax Plus, Molecular Devices con software SOFTmax PRO para los cálculos

Lavadora de placas

Agitador de placas

Pipetas; de un canal y de múltiples canales

Materiales

Placas Maxisorp de 96 pocillos

Cinta de sellado

ES 2 687 671 T3

Reactivos

Tampón de recubrimiento

Solución salina tamponada con Tris (TBS): Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4.

5 Tampón de lavado

TBS (tampón de recubrimiento) se complementa con 0,1 % de Tween-20.

Se añade 1 ml de Tween-20 a 1 litro de TBS.

10

Tampón de bloqueo

Tampón de bloqueo SuperBlock en TBS (Pierce).

15 Tampón de dilución

Se añaden 10 ml de tampón de bloqueo a 90 ml de TBS (tampón de recubrimiento).

Inmunoglobulinas policlonales contra rhASA

20

El medio de células CHO-rhASA se purifica por afinidad en una columna con anticuerpo monoclonal frente a rhASA (5,7) reticulado a la Proteína A. Se inmuniza a los conejos con rhASA purificada por afinidad (DAKO) y se verifica que los antisueros reaccionan con rhASA con transferencia de tipo western. El suero de conejo se purifica en una o más columnas de proteína G HiTrap.

25 La fracción de IgG se almacena en 50 % de glicerol, Na-Pi 10 mM, NaCl 75 mM, a pH 7,2 a 4 °C. La concentración de proteína es de 1,25 mg/ml, determinada con el kit de ensayo de proteína BCA.

Patrón de rhASA

30 Como patrón se usa rhASA purificada, lote M0208 El patrón se purifica a partir del sobrenadante de células CHO-rhASA con tres etapas de purificación consecutivas, DEAE sefarosa, HIC octil sefarosa y Mustang Q. La reserva se almacena en un 50 % de glicerol, Tri-HCl 10 mM a pH 7,5 a 4 °C. La concentración, determinada con el kit de ensayo de proteínas BCA, se estima en 100 µg/ml.

35 Anticuerpo monoclonal frente a rhASA

El sobrenadante de un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal frente a rhASA (mab) (19-16-3 del Prof. Gieselmann, Bonn) se purifica en una columna de proteína A HiTrap.

40 El mab se almacena a -20 °C en Na-Pi 20 mM, NaCl 0,145 M, a pH 7,2 (PBS) suplementado con azida sódica al 0,02 %. Una porción de trabajo se mantiene a 4 °C durante 6 meses.

Inmunoglobulinas anti-HRP de ratón

45 Las inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con peroxidasa de rábano picante y aisladas por afinidad se adquieren en DAKO (P 0447) y se almacenan a 4 °C.

Sustrato de TMB.

50 El sistema de sustrato de una etapa que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se adquiere en DAKO (S 1600) y se almacena a 4 °C.

Solución para el cese de la reacción

H₂SO₄ 1M

55

Procedimiento

Recubrimiento

60 La reserva de IgG policlonal anti-rhASA se diluye a 1: 1000 en TBS a 1,25 µg/ml y se añaden 100 µl/pocillo a la placa maxisorp de 96 pocillos. La placa se incuba durante la noche a temperatura ambiente y se lava dos veces con ~250 µl de tampón de lavado.

Bloqueo

65

ES 2 687 671 T3

Se añaden 200 µl de tampón de bloqueo por pocillo antes de la incubación a temperatura ambiente con agitación durante al menos 15–60 minutos.

Captura de rhASA

- 5 Se añaden 100 µl de tampón de dilución a todos los pocillos.

- 10 Patrón de rhASA: La solución madre patrón de rhASA se diluye 2.000 veces en tampón de dilución por triplicado a 50 ng/ml. Los triplicados de 100 µl del patrón se transfieren a la placa de 96 pocillos y se preparan diluciones por dos en serie.

- 15 Muestras: Las muestras se diluyen por triplicado en tampón de dilución a una concentración estimada de rhASA de alrededor de 25 ng/ml. Se transfieren 100 µl de cada muestra a la placa de 96 pocillos. Se preparan 2-8 diluciones por dos en la placa.

La placa se incuba durante 100–140 minutos a temperatura ambiente y con agitación, y, posteriormente se lava cuatro veces con ~250 µl de tampón de lavado.

- 20 Detección con anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal (mab) frente a rhASA se diluye a 1:2000 a 185 ng/ml en tampón de dilución y se añaden 100 µl a cada pocillo. La placa se incuba durante 70–120 minutos a temperatura ambiente con agitación y posteriormente se lava cuatro veces con ~250 µl de tampón de lavado.

- 25 Detección de mab en complejo con IgG anti-ratón-HRP

- 30 La IgG anti-ratón-HRP se diluye de 1:2000 a 500 ng/ml en TBS (tampón de recubrimiento) y se añaden 100 µl a cada pocillo. Las placas se incuban durante 70-120 minutos a temperatura ambiente y con agitación y posteriormente se lavan cuatro veces como anteriormente.

Desarrollo de color

- 35 Se añade sustrato TMB (100 µl) a cada pocillo y las placas se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente sin agitación. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M (para detener la solución) y se mide la absorbancia a 450 nm con la lectura final en el espectrofotómetro de placas.

Evaluación

- 40 Las concentraciones de rhASA se calculan utilizando el software SOFTmax PRO (...) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
La parte lineal de la curva patrón se representa mediante regresión lineal y la concentración de muestras desconocidas se lee a partir de la curva patrón.

- 45 HPLC de fase inversa para el análisis de rhASA

- 50 La pureza de la arilsulfatasa A (rhASA) se determina mediante HPLC de fase inversa, controlando la absorción de UV a 220 nm. La elución se obtiene con una concentración creciente de modificador orgánico (acetonitrilo) en la fase móvil. Los tiempos de retención para rhASA y otros componentes en la muestra dependen de su capacidad para adsorber y desorber a la fase estacionaria no polar, que, a su vez, depende de factores tales como la conformación, hidrofobicidad y secuencia de la proteína.

Materiales y equipamiento

- 55 Sistema de HPLC Hewlett Packard modelo 1090 equipado con un sistema de bomba terciaria, autoinyector automático, detector de matriz de diodos, controlado por HP Chemstation versión A.06.03. Se pueden usar sistemas de HPLC equivalentes siempre que la prueba de idoneidad del sistema verifique un rendimiento adecuado.

- 60 Filtro para la concentración de la muestra: Centriplus YM-30, Millipore corp.

Columna analítica: Zorbax 300SB-C18, 2.1 * 150 mm de 5 micrómetros, Rockland Technologies Scientific, Inc.

Filtro en línea: Filtro en línea A-102X y cartucho de filtro en línea 1*1 mm, Upchurch Scientific, Inc.

- 65 Filtro para la preparación de muestras: Whatman Anatope 10 LC

Sustancias químicas y reactivos

Agua Milli-Q, agua de calidad HPLC o equivalente

5 Acetonitrilo, UV lejano, calidad de HPLC (VWR, LiChrosolve o equivalente)

Ácido trifluoroacético (TFA), 10 ampollas de 1 g (Pierce)

Base Tris de calidad p. a. (Angus o equivalente)

10

Cloruro de guanidinio de calidad p. a. (de calidad bioquímica VWR o equivalente)

Fase móvil A: Disolver 1 ampolla de TFA (1 g) en 1 litro de agua Milli-Q

15 Fase móvil B: Disolver 1 ampolla de TFA (1 g) en 1 litro de acetonitrilo

Diluyente de muestras: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5

Solución de limpieza de columnas 1: Isopropanol al 50 % de calidad p.a. en agua

20 Solución de limpieza de columnas 2: Cloruro de guanidinio 6M

Patrón de rhASA (purificado en una columna de mab frente a ASA/proteína A Sepharose. Informado en el resumen experimental de n.º de exp. M-6). Si no se dispone de rhASA purificada por afinidad, se pueden usar muestras de menor pureza del esquema de purificación de rhASA como patrón.

25

Todas las demás sustancias químicas y reactivos fueron de calidad p.a. si no se indica lo contrario y se adquirieron en las fuentes comerciales habituales.

Procedimiento

30

Condiciones instrumentales

Composición de la fase móvil

A Agua, 0,1 % de TFA

B Acetonitrilo (AcN), 0,1 % de TFA

Caudal

0,2 m/mn

35

Temperatura:

+40 °C

Volumen de inyección de la muestra:

Extracto bruto

20 µl (si está concentrado a 0,3 mg/ml)

Muestras en proceso:

20 µl (si está concentrado a 0,3 mg/ml)

40

Muestras purificadas por afinidad:

5 µl (si 1,0 mg/ml)

Gradiente:

Tiempo (min)	% de A	% de B
1,00	70	30
10,00	40	60
15,00	5	95
20,00	5	95
25,00	70	30
30,00 (después del tiempo)	70	30

1,00

70

30

45

10,00

40

60

15,00

5

95

20,00

5

95

25,00

70

30

30,00 (después

70

30

del tiempo)

50

Lavado de columna (realizado cada 5ª inyección):

Inyección de 25 µl de isopropanol al 50 % (calidad p.a.) como muestra y un ciclo del gradiente indicado anteriormente para limpiar la columna.

55

Preparación de la muestra y el patrón

Las muestras de rhASA con una concentración de proteína inferior a 100 µg/ml se concentran en un dispositivo de filtro de centrifuga Centriplus (modelo YM-30, Millipore Corp.).

60

El producto retenido obtenido se ajusta a una concentración de proteína de 1,0-0,3 mg/ml con Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 y se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar cualquier partícula y proteínas que hayan precipitado. En el caso de pequeños volúmenes de muestra, la filtración puede reemplazarse por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos.

65

Cromatografía

Las muestras se cargan y se pasan por el cromatógrafo mientras la temperatura se mantiene baja (+ 8 °C) si es posible.

5 Integración y cálculo de pureza

El área bajo la curva medida a 220 nm para el pico de rhASA se calcula y se relaciona con el área integrada total. La pureza se indica como el porcentaje de rhASA de proteína total. Usar los parámetros de integración en el apéndice (diseñado para el software Hewlett Packard/Chemstation Agilent 06.03) como base para la integración. Como la integración del pico principal de la rhASA no siempre es óptima con los parámetros de integración preestablecidos, puede ser necesaria la integración manual. Diferentes softwares de HPLC también pueden requerir diferentes parámetros de integración, que deben probarse individualmente para cada sistema.

10

Evaluación

15

Identidad: La retención del pico principal de la muestra debe ser de ± 0,5 minutos en comparación con el patrón de rhASA.

Pureza: La pureza de la muestra se determina comparando el área integrada del pico principal en comparación con el área integrada total. La pureza se indica como el % de datos brutos del pico principal (rhASA)

20

Los archivos de los datos brutos se almacenan en un servidor o en discos CD-ROM.

Apéndice

25

Parámetros de integración

Los parámetros de integración dependen mucho del instrumento y del sistema, y deben evaluarse para los diferentes sistemas utilizados. Los siguientes parámetros de integración están optimizados para el software HPLC Agilent/Hewlett Packard ChemStation versión 06.03.

30

Acontecimiento	Valor	Tiempo
Sensibilidad de la pendiente	10,0	inicial
Anchura del pico	0,2	inicial
Rechazo del área	5,0	inicial
Rechazo de la altura	1,0	inicial
Detección de resaltos	de descenso	inicial
Integración	DESACTIVADO	0,000
Integración	ACTIVADO	5,000

35

40

45 Esquema de propagación celular continua

La propagación continua de células de mamífero se ha desarrollado en biorreactores B. Braun de 5 l equipados con dispositivos de retención celular Bio-Sep de AppliSens. El principio del proceso se presenta esquemáticamente en la Figura 2. Las células de mamífero son células capaces de amplificación y producción de proteínas extrañas como un cultivo de suspensión en biorreactores o fermentadores a gran escala.

50

Durante el desarrollo del proceso, la línea celular se mantiene y se propaga en medio Excel 302 (número de catálogo 81045 de JRH Biosciences). Este es un medio libre de suero, que está desprovisto de proteínas de origen animal o humano. Además, el medio, que no contiene rojo fenol, se complementó con factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y con glucosa. La concentración de glucosa se controla y ajusta a niveles óptimos durante el proceso.

55

La ASA humana recombinante producida por el proceso de cultivo continuo en el biorreactor de 5 l de B. Braun se expresa actualmente en células CHO DG44. La amplificación de las células CHO después de la descongelación se inicia en matraces T y, después, las células se transfieren a matraces giratorios. Antes de dividir e inocular el cultivo del biorreactor, el cultivo de centrifugación tiene una densidad celular de $1,3 \cdot 10^6$ células/ml con una viabilidad del 96 %.

60

En preparación para el proceso de cultivo, las células se transfieren desde los matraces giratorios a los biorreactores. Los datos sobre las densidades celulares en el biorreactor antes y después de la inoculación se

65

pueden deducir de la tabla 1 a continuación. También se indican los valores iniciales típicos de viabilidad, glucosa, agitación, pH, pO₂ y temperatura.

5 Cuando se propagan y mantienen como se ha descrito anteriormente, las células no se agrupan y se propagan y producen como cultivos en suspensión.

Parte de la propagación, el mantenimiento y la producción del cultivo CHO DG44 es la cosecha de 1 a 4 volúmenes de reactores de medio al día. Para compensar la cosecha, el cultivo se complementa con la misma cantidad de medio fresco al día.

10 El proceso de cultivo continuo puede mantenerse durante un período de más de 500 horas y es preferible una fase de producción de 2 semanas o más. Para aumentar el rendimiento, es deseable bajar la temperatura de 37 °C a 32–35 °C una vez que se alcanza la meseta de la fase de producción. Se obtienen valores de densidad celular en y por encima de 1,2 x 10⁷ células/ml y se demuestran productividades superiores a 3,0 pg/célula/día, lo que da como resultado > 20 mg de rhASA/l en este sistema. Durante el proceso, los parámetros: glucosa, lactato, glutamina, amonio y la osmolaridad se miden y controlan.

20 Tabla 1: Parámetros principales para el sistema de cultivo celular. La eficiencia de la retención celular (CRE) es una medida, indicada como un porcentaje, de la eficacia con la que el dispositivo de retención celular separa las células del medio y las devuelve al recipiente de cultivo. El sangrado es una recolección deliberada de un medio que contiene células. El parámetro diferencial integral proporcional (PID) es relevante cuando se controla la forma en que un proceso alcanza y mantiene puntos de referencia definidos. El estado de producción estable es un conjunto de parámetros del proceso, elegidos porque se cree que respaldan una producción óptima. El objetivo es mantener el proceso en estos parámetros durante un período más largo, el estado de producción estable y el producto de cosechas 10 durante este período. El cultivo celular se realiza en un medio sin suero y con la adición de menos de 1 mg/l de proteínas humanas recombinantes con un peso molecular de menos de 10 kDa.

30	Parámetros	Valores
	Volumen	1000 ml, 5000 ml, 15 l 100 l, 400 l, 700 l
	Agitación	100 – 165 rpm
	Temperatura	37° (reducir a 32 °C – 35 °C)
	Tasa de recirculación	3 a 4 veces la velocidad de perfusión
35	Parámetros de separación	CRE por encima del 95 %
	Sangrado	0–10 % del volumen del biorreactor al día
	Glucosa	2–4 g/l
	Lactato	0,13 – 5,0 g/l
40	Oxigenación	Pulverización de oxígeno puro + ajustes del parámetro PID
	pO ₂	30 – 40 %
	Velocidad de perfusión	Hasta 4 vol/día
45	Viabilidad celular en la inoculación	>93 %
	Viabilidad celular en la fase de producción	>90 %
	Densidad celular en la inoculación	3,6 X 10 ⁶ células/ml
	Densidad celular	10-14 X 10 ⁶ células/ml durante la producción
	Producción de ASA específica	1,5 – 3,0 pg/célula/día
50	Rendimiento de proteínas por biorreactor al día	> 170 mg/día (volumen en reactor de 5 l)
		> 1 g/día (volumen en reactor de 100 l)
	pH	6,8 ± 7,3
	Estado de producción estable	Pendiente de definir

55 Esquema del proceso de purificación

Aclaración y reducción de virus

60 Se aclaran 20 l de medio (actividad de ASA en el intervalo de 0,3–1,5 U/ml) a través de una secuencia de filtros de profundidad de Millipore (Polygard D5 5 µm + Opticap FF y Opticap 0,45 µm). Para la reducción de virus, se añade Tween 80 a una concentración final de 1 % y se deja al menos 30 minutos (durante la noche también es posible) a + 4 °C.

65 Aplicación a la producción en un biorreactor de 15 l: ~300 l (1-2 U/ml) cosecha/cultivo (36 días). ¿Cuántos filtros se necesitan? Sugerencia: Aclarar cada tres días durante la perfusión, 45 l/filtración. Aplicación a la producción en un biorreactor de 100 l; ~2000 l de cosecha/cultivo. 300 l/filtración.

Concentración/Diafiltración con filtración de flujo tangencial (TFF)

5 El filtrado se concentra 10–20 veces en volumen usando TFF a presión transmembrana (TMP) de 15 psi en un sistema Sartoflow con un marco de Sartorius (Sartorius). Se usa un tamiz Millipore Biomax de 30 kDa de tipo A con 0,1 m² de área. Después de la concentración, la diafiltración se realiza frente a Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 o frente a tampón de fosfato de sodio 10 mM (tampón estándar), a pH 7,5, aproximadamente 2 volúmenes hasta que la conductividad es de aproximadamente 4 mS/cm. Finalmente, el medio se filtró a través de un filtro Opticap de 0,45 µm.

10 Ejemplo: Para 20 l de filtrado (cosecha aclarada) se usa una membrana de 0,1m². El rendimiento esperado es 90-100 %.

15 Aplicación a la producción en un biorreactor de 15 l: Concentrar totalmente ~ 300 l de filtrado a ~ 15 l (20-40 U/ml) y cambiar 2 volúmenes de tampón. Sugerencia: TFF cada 6 días durante la perfusión. Concentrar 90 l a 4,5 l, 3-4 veces por cultivo.

Aplicación a la producción en un biorreactor de 100 l: 2000 l a 100 l y cambiar 2 volúmenes de tampón. Concentrar 300 l a 15 l, 3-4 veces/cultivo.

20 Etapa 1: Etapa de captura–DEAE sepharose FF (Amersham Biotech)

25 La muestra de la etapa 1 (que corresponde a 50.000 U de actividad total) se aplica sobre una columna de DEAE-sefarosa de 800 ml empaquetada en una columna de 70 mm de diámetro (Pharmacia Index 70/500) equilibrada con tampón estándar. El caudal es de 80-120 cm/h. La proteína unida al gel de DEAE se lava con 2-3 volúmenes de columna (VC) de tampón estándar, seguidos de 2-3 VC de NaCl 0,1 M en tampón estándar.

La rhASA se eluye con 3-4 VC de NaCl 0,3 M en tampón estándar. Las fracciones que contienen actividad de rhASA se combinan y se usan para una purificación adicional. El rendimiento normal es del 90 % y la pureza de aproximadamente 30-40 %.

30 Para la producción a gran escala, la etapa de captura se realiza, preferentemente, utilizando la tecnología de Adsorción de lecho expandido–STREAMLINE DEAE

35 Se equilibra un STREAMLINE DEAE en una columna Direct STREAMLINE con tampón de fosfato sódico a pH 7,1+ manitol 200 mM (concentración final). La resina se expande a 3 veces el volumen del lecho sedimentado (VLS). La muestra que contiene arilsulfatasa A se mezcla, preferentemente en línea, con manitol 300 mM, 1: 1, y se aplica en la columna. Como alternativa, la muestra se agita continuamente con un centrifugador superior después de la mezcla. La conductividad es ~7 mS/cm. La resina se lava con 2 VLS de tampón de equilibrio, seguido de 8 VLS de tampón de fosfato de sodio a pH 7,1+ NaCl 0,06 M. y la rhASA se eluye con 8 VLS de tampón de fosfato de sodio a pH 7,1+ NaCl 0,35 M y se recogen 4-6 VLS.

40 El flujo es ascendente y 300 cm/h.
El rendimiento estimado es del 95 % y la pureza estimada es del 30-40 %.
La capacidad es de 80 U de ASA (~1 mg)/ml de adsorbente.
CIP de inmediato.

45 Aplicación a la producción en un biorreactor de 5 l y 15 l:

1,4 l de columna STREAMLINE Direct 95/1,0 = altura del lecho sedimentado 20 cm (~ 60 cm expandido). La cosecha se carga dos veces a la semana. Para un biorreactor de 15 l, la carga corresponde a 135 y 180 L después de la dilución. El grupo de 5,5-8 l de rhASA se eluye en cada ciclo.

50 Límite de capacidad de la columna: 80 U/ml de adsorbente. Carga máxima de rhASA en 1,4 l de adsorbente = 112 000 unidades (~ 1,4 g de rhASA), que corresponde a una cosecha máxima de 1,2 U/ml (15 mg/l si la actividad específica es de 80 U/mg) en la cosecha de un grupo de 4 días y máx. 1,7 U/ml (21 mg/l) de un grupo de 3 días.

Aplicación a la producción en un biorreactor de 100 l:

55 12,3 l de Columna STREAMLINE Direct 280 = altura del lecho sedimentado de 20 cm (~60 cm expandido). La cosecha se carga dos veces/semana, lo que corresponde a una carga de 900 y 1200 l después de la dilución. El grupo de 50-70 l de rhASA se eluye en cada ciclo.
Capacidad: 984 000 U corresponde a 1,6 U/ml (20 mg/ml) en la cosecha de un grupo de 4 días y 2,2 U/ml (27 mg/ml) en un grupo de 3 días.
60 Cuando se utiliza una altura de lecho de 30-50 cm y 15,4-30,8 l de adsorbente, la capacidad es de 1,2-2,5 10⁶ U, que corresponde a 2,0-4,1 U/ml (grupo de 4 días) y 2,7-5,5 U/ml (grupo de 3 días).

65 El reemplazo de la cromatografía aniónica convencional (DEAE sepharose FF) con tecnología de adsorción de lecho expandido se ve favorecida para la producción a gran escala, ya que hace que la concentración/diafiltración previa con filtración de flujo tangencial (TFF) (etapa 1) sea redundante.

Etapa 2: Etapa intermedia 1–Butil Sepharose FF (Amhersam Biotech)

5 El grupo de muestras de la etapa 2 se mezcla a 1:1 con Na₂SO₄ 1,0M en tampón estándar y se aplica sobre 800 ml de octil Sepharose empaquetado en una columna de 70 mm de diámetro (Pharmacia Index 70/50) equilibrada con tampón estándar + Na₂SO₄ 0,5 M. El caudal es de 60 a 120 cm/h. La columna se lava con 1-2 VC de tampón de equilibrio, seguidos de 1-2 VC de acetato de Na 1,8 M en tampón estándar a pH 7,5. La rhASA se eluye con 1,5-3 VC de acetato de Na 0,9 M en tampón estándar a pH 7,5 y las fracciones que contienen actividad se combinan y se usan para purificación adicional. El rendimiento normal es del 90 % y la pureza del 70-87 %.

10 Como ejemplo, la muestra de la etapa 1 correspondiente a 53 000 U de actividad de arilsulfatasa analizada máxima se aplica en una columna de Butil Sepharose 4FF de 600 ml (empaquetada en una columna Pharmacia Index 70/50). La capacidad es de 100-300 U/ml de gel.

15 Aplicación a la producción en un biorreactor de 15 l: El volumen de la columna HIC es de 1,1-3,5 l. Tres fracciones eluidas de la etapa 1 se mezclan con 33-50 l de Na₂SO₄ 1M y se carga dos veces por cultivo en biorreactor. Se eluyeron/pasaron 11 l (o 3,5 l) del grupo de rhASA. Con la condición de que la rhASA eluida pueda almacenarse sin riesgo de contaminación por bacterias, los dos ciclos en HIC podrían intercambiarse por un solo ciclo en una columna más grande, seguida de una sola etapa.

20 Aplicación a la producción en un biorreactor de 100 l: ~25 (o 8) l de columna.

Etapa 3: concentración y diafiltración con TFF

25 El grupo de muestras de la etapa 3 se concentra a aproximadamente 1 mg/ml con TFF contra un tamiz Biomax A de 30 kDa. La diafiltración se realiza frente a 3-5 volúmenes de acetato de Na 20 mM, a pH 5,4-5,7. El rendimiento normal es del 90–100 % y la pureza es la misma que en la etapa anterior. Como alternativa, la mezcla se concentra a ~4 mg (proteína total)/ml y el tampón se cambia a fosfato de sodio 2 mM, a pH 7,5 mediante 6 volúmenes de diafiltración. La diafiltración se realiza a presión transmembrana (TMP) de 15 psi con el tamiz A Biomax de 30 kDa, membrana de poliétersulfona (Millipore). El rendimiento es del 90-100 % y la pureza es igual que en la etapa 4.

30 Aplicación a la producción en biorreactor de 15 l Concentrar de ~ 11 l a ~ 2 l y cambiar el tampón con 6 volúmenes de Na-Pi 2 mM a pH 7,5. Dos veces/cultivo.

35 Aplicación a la producción en un biorreactor de 100 l: Concentrar de ~80 l a ~16 l.

Opcionalmente, la concentración y la diafiltración son precedidas por una inactivación viral con Tween-80: La fracción eluida de la etapa 2 se mezcla con Tween-80 (C₁₈H₃₄O₂₆) a una concentración final de 1 % y se deja durante al menos 1 hora.

40

Etapa 4: Etapa de pulidoMembrana Mustang-S o Blue Sepharose (etapa pasiva) + membrana o intercambio aniónico (etapa activa)

45 *Breve descripción*: Una membrana Mustang-S o Blue Sepharose se acopla en serie a un intercambiador aniónico de alta resolución (por ejemplo, Source-Q de Amhersam Biotech o membrana Mustang Q). Las columnas se equilibran con > 10 VC de acetato de sodio 20–100 mM a pH 5,4–6,0. El grupo de muestras de la etapa 4 se carga en las columnas después del ajuste del pH mezclando 1: 1 con NaAc 0,1 M a pH 5,6 (rhASA pasará a través de la membrana Mustang-S/Blue Sepharose y se capturará en el intercambiador aniónico de alta resolución). La membrana Mustang-S/Blue Sepharose se desacopla y el intercambiador aniónico de alta resolución se lava con 2-10 VC de acetato de sodio 20–75 mM a pH 4,8.

50 El intercambiador aniónico se reequilibra con > 10 VC de Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 (tampón estándar) o, como alternativa, con 10 volúmenes de columna de tampón de Na-Pi 10 mM, a pH 7,5. La columna se lava con NaCl 0,1M en tampón estándar o, como alternativa, con NaCl 0,06 M en Na-Pi 10 mM, a pH 7,5 y se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,3 M en tampón estándar o, como alternativa, con un gradiente de NaCl 60-500 mM en Na-Pi a pH 7,5. Las fracciones de rhASA activa se recogen.

60 El caudal es de 100-120 cm/h, el rendimiento estimado es del 90 % y la pureza del 98-100 %. Capacidad > 40 mg/ml para Blue Sepharose y ~ 30 mg/ml para Source 30Q.

Aplicación a la producción en un biorreactor de 15 l: Se pasan por Blue Sepharose de 200 ml y una columna Source 30Q de 300 ml dos veces/cultivo. Cargar el grupo de 4 después de bajar el pH por dilución 1:1 con NaAc 0,1 M a pH 5,6 = 4 l.

65 Aplicación a la producción en un biorreactor de 100 l: ~ 1,3 l de Blue Sepharose y 2 l de Source 30Q, dos veces/cultivo.

Etapa 5: Etapa de filtración de virus

La filtración de virus se realizará en el grupo de productos de la etapa 5 usando un filtro estéril de 0,1 micrómetros seguido de un nanofiltro DV 20 de Pall con una presión constante aplicada de 20–50 psi. El caudal estimado en la escala del proceso es de 25 l/h.

Como alternativa, se podría aplicar 1 % de Tween 20 u 80 al sobrenadante (tiempo de contacto 30-60 minutos) antes de la primera etapa de concentración y diafiltración (etapa 1).

Etapa 6: Etapa de diafiltración/formulación

Se realiza filtración de flujo tangencial (TFF) contra un tamiz Millipore Biomax de 30 kDa de tipo A contra 5-10 x volúmenes de tampón de formulación. Los tampones de formulación más probables se presentan a continuación

	Tampón de formulación 1.	
	Na ₂ HPO ₄	3,50–3,90 mM
	NaH ₂ PO ₄	0-0,5 mM
	Glicina	25-30 mM
	Manitol	230-270 mM

Agua para inyectables (WFI)

Tampón de formulación 2.

Tris-HCl 10 mM

Glicina 25–30 mM

Manitol 230-270 mM

Agua para inyectables (WFI)

Tampón de formulación 3.

	Na ₂ HPO ₄	3,50–3,90 mM
	NaH ₂ PO ₄	0-0,5 mM
	Glicina	25-30 mM
	Manitol	230-270 mM

Agua para inyectables (WFI)

El pH y la osmolalidad en ambos tampones de formulación se equilibrarán a 7,5 ± 0,2 y 300 ± 50 mOsm/kg, respectivamente. La concentración de proteína final debe ser de acuerdo con la especificación (> 5 mg/ml).

Etapa 7: Formulación, carga

Formulación y forma de dosificación

En el desarrollo de la forma de dosificación, la estabilidad de la rhASA es un factor importante a considerar. En la actualidad, todos los datos de estabilidad apuntan hacia una solución acuosa estable. El polvo liofilizado es actualmente nuestra estrategia de respaldo.

Las opciones en este momento son los dos tampones de formulación diferentes que se describen en la etapa 7: Tampón de formulación 1 y 2.

Ambas formulaciones son conocidas por estabilizar las proteínas en soluciones acuosas así como en polvos liofilizados. El pH y la osmolalidad en ambos tampones de formulación se equilibrarán a 7,5 ± 0,2 y 300 ± 50 mOsm/kg, respectivamente. La concentración de proteína final debe ser de acuerdo con la especificación y en el intervalo de 5-20 mg/ml.

La carga de rhASA se realizará en una unidad de producción de acuerdo con la práctica GMP de la UE y en una sala clasificada como DE Clase A. Durante la producción, la zona de carga se controla con recuento de partículas y placas de sedimentación. El personal es formado regularmente de acuerdo con las GMP de la UE y se controla después de cada producción con impresiones de guantes. La esterilidad del equipo y los materiales se aseguran mediante procedimientos de esterilización validados.

Conclusión

ES 2 687 671 T3

El proceso de purificación descrito consiste en 7 etapas y se producen dos sublotos por cultivo en biorreactor. El rendimiento global es del ~60-70 %. La pureza es de al menos un 95 %. El contenido de proteínas de la célula huésped debe ser < 200 ng/mg con un valor objetivo < 100 ng/ml. Para reducir aún más las HCP, puede ser necesario reducir el rendimiento para la etapa intermedia la de pulido.

5

10

Tabla 2: Diagrama de flujo del proceso de purificación.

Etapa	Análisis en proceso	Tiempo de reposo a +5 °C de producto de la etapa
Recolección	42	~ 4 días
1. Captura:EBA	42	30 días
2. Intermedia: Butil Sefarosa	42, CMC-A280 nm	Al menos durante la noche
3. TFF	42, CMC-A280, 38	Al menos 15 días
4. Pulido: Blue+ Source Q	42, CMC-A280, 38	30 días
5. Filtración de virus	42, CMC- A280	30 días
6. TFF, sustancia farmacológica a granel	42, 34 o/y CMC-A280, 38, LAL, recuento bacteriano, pH, osmolalidad, CMC-HCP ELISA	Estable
7. Carga	Pendiente de decidir 42, 34 o/y CMC-A280, 38, LAL, recuento bacteriano, osmolalidad, HCP ELISA CMC	Estable

25

Tabla 3: Procedimientos analíticos

N.º de Dora	Procedimientos de análisis
34	Determinación de proteínas de rhASA mediante el kit de ensayo de proteínas BCA Protocolo de placas de microtitulación o DO
CMC-A280	Determinación de proteínas, DO a A280 nm
35	Análisis SDS-PAGE de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA)
38	Análisis HPLC de fase inversa de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA)
9213	Cuantificación de la composición de carbohidratos de las glicoproteínas mediante HPLC de fase inversa con detección de fluorescencia
35	40 Transferencia de tipo western de SDS-PAGE para análisis de las proteínas de las células huésped CHO
43	Método de ELISA para la determinación de las proteínas de las células huésped CHO
CMC-HCP ELISA	Método de ELISA para la determinación de las proteínas de las células huésped CHO/CMC
40	42 Ensayo enzimático para analizar la actividad de arilsulfatasa A, ASA. Protocolo de placas de microtitulación
28	Método de ELISA para la determinación de las concentraciones de arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA)

45

Tabla 4: Análisis realizado en Zymenex

N.º de Dora	1,1.1.1.1 Cuando
9213	Tras la etapa 6 o después, ocasionalmente
43	Tras la etapa 6 o después, ocasionalmente
40	Tras la etapa 6 o después, ocasionalmente
50	35, 28 Tras uno ocasional

55

Procedimientos de limpieza *in situ* (CIP):

60

Etapa 1: STREAMLINE DEAE: Flujo ascendente, 100 cm/h inmediatamente después de cada ciclo. 8-10 VLS de NaCl 1 M, 5 VLS de NaOH 1 M para desechar, después, recirculación > 6 h, H₂O, ácido cítrico/HAc si es necesario. Almacenar 20 % de EtOH.

65

Etapa 2 Butil Sepharose: Flujo ascendente, ~30 cm/h. Después de cada ciclo de CIP en flujo invertido con 1-2 VC de H₂O, 1-2 VC de NaOH 1 M (40 min de tiempo de contacto), 1-2 VC H₂O y 1-2 VC de 20 % de EtOH. Almacenar en 20 % de EtOH.

Etapas 3 y 6 Membrana TFF, Biomax de 30 kDa: Lavar con agua destilada, seguido de NaOH 0,5 M y, después, NaOH 0,1 M. Almacenar en NaOH 0,1 M.

Etapa 4 Blue Sepharose: Después de cada ciclo de CIP en flujo invertido con 2 VC de NaCl 1M, 2 VC de H₂O, 1-2 VC de NaOH 0,1 M (40 min de tiempo de contacto), 1-2 VC de H₂O y 1-2 VC de 20 % de EtOH. Almacenar en 20 % de EtOH.

5 Source Q : Flujo ascendente Después de cada ciclo a CIP en flujo invertido con 2 VC de NaCl 2 M, 2 VC de H₂O, 1-2 VC de NaOH 2 M (40 min de tiempo de contacto), 1-2 VC H₂O y 1-2 VC de 20 % de EtOH, caudal ~30 cm/h. Almacenar en 20 % de EtOH.

Resultados

10 Los datos para las preparaciones de rhASA obtenidas a través de un procedimiento de purificación descrito anteriormente se presentan en las tablas 5 y 6. En resumen, los resultados muestran que el rendimiento total del proceso de purificación corresponde al 79 % de la rhASA presente en el material de partida. La pureza de la rhASA en la preparación resultante corresponde a 98,0 % como se determina por HPLC de fase inversa. Los resultados se muestran en la figura 3. Las condiciones específicas para el procedimiento para el que se muestran los datos son las siguientes:

Etapa 1-3: Como se ha descrito anteriormente.

20 Etapa 4: Una membrana Mustang-S de 10 ml se acopla en serie con un intercambiador aniónico de alta resolución (Resource-Q de Amhersam Biotech, 6 ml). Las columnas se equilibran con > 10 VC de acetato de sodio 20 mM a pH 5,5. La rhASA de Tox03HC20 es tampón intercambiado con el tampón de equilibrio y cargado en las columnas. Después de pasar la membrana Mustang-S, se capturará rhASA en la columna Resource-Q. La membrana Mustang-S se desacopla y la columna Resource-Q se lava con 3 VC de acetato de sodio 75 mM a pH 4,8. La columna Resource-Q se lava con > 10 VC de Tris-HCl 20 mM a pH 7,5 (tampón estándar) hasta que se alcanza el pH correcto. La columna se lava con NaCl 0,1 M en tampón estándar y se eluye la rhASA con un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,3 M en tampón estándar. Se recogen fracciones que contienen rhASA activa.

30 Tabla 5: Esquema de purificación Tox03HC20, que se ha usado para la evaluación de la etapa de pulido. La actividad enzimática en el esquema puede variar debido a los cambios del procedimiento durante el desarrollo

Etapa	Volumen (ml)	Actividad total (U)	Rendimiento (% de actividad)	Pureza (% mediante rp-HPLC)
TFF	7990	54358	n.d.	n.d.
<u>Captura:</u> DEAE	2250	61537 (¿alta?)	n.d.	n.d.
<u>Intermedia:</u> Butilo	720	42768	n.d.	n.d.
TFF	655	49125 (según la actividad promedio 75 U/ml)*	90 % (ligeramente en el lado alto)	92 %
n.d. = no determinado				

50 Tabla 6: Resultado del desarrollo de la prueba de pulido a pequeña escala utilizando Tox03HC20 como material de partida. Probar Mustang-S (pasiva) + Recurso-Q (activa) como etapa de pulido.

Etapa	Volumen (ml)	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (% de actividad)	Pureza (% mediante rp-HPLC)
Inicio: Tox03H C20	3,2	293	11	26,6	100	91,2 %
<u>Grupo de pulido</u>	19,0	249	8,7	28,5 (factor de purificación de 1,07)	85 % (según la actividad) 79 % (según la proteína)	98,0 %

Especificación del producto

Especificación de la sustancia a granel para i.v. Pruebas de toxicología de la arilsulfatasa A recombinante humana (rhASA). Las pruebas analíticas se realizan antes de la filtración en esterilidad y la carga en viales al final del proceso de purificación.

5 Descripción:

Arilsulfatasa A humana recombinante (rhASA) en solución para administración i.v.

10 La vida útil es de 6 meses desde la producción si se almacena a -20 °C. El tiempo de uso es de 1 semana a partir de la descongelación si se almacena a + 5 °C.

	PRUEBA	N.º DE PROCEDIMIENTO	LÍMITE
15	Contenido		
	Actividad específica de rhASA (Unidades/mg)	Actividad enzimática de rhASA	≥ 50 U/mg Real: 60–120 U/mg
20	Concentración de proteína rhASA (BCA) (mg/ml)	2500–P– 1034	≥ 5 mg/ml
	Identidad		
	Pico principal del tiempo de retención en HPLC (con respecto al patrón)	2500–P– 1038	Aprobado
	Pureza		
25	HPLC (% del pico principal)	2500–P– 1038	> 95 % Real >97 %
	Proteínas de las células huésped (HCP) (ng/mg de proteína)	2500–P– 1041	<200 ng/mg Real: 50 – 100 ng/mg
30	Otras pruebas		
	Recuento bacteriano, filtración de membrana (ufc/ml)	Ph.Eur.	≤ 10 ufc/ml
	LAL (UI/mg) (máx. 2,5 mg de rhASA/kg)	Ph.Eur.	≤ 2 UI/mg de rhASA
35	Osmolalidad (mOs/kg)	Ph.Eur.	250 ± 350
	pH	Ph.Eur.	7,2 ± 8,2

40 Ejemplo 2: Análisis de la unión de rhASA a la resina de intercambio catiónico y la resina de intercambio aniónico

Descripción del experimento:

Se mezclaron 5 mg/ml de rhASA (Tox03HC20) a 1: 10 con tampones a pH 4,8–7,2

45 El intercambiador catiónico (Unosphere-S, BioRad) + intercambiador aniónico (DEAE FF, Amhersam Biotech) se dividió en tubos de ensayo y se equilibró con acetato de Na 20 mM a pH 4,8, 5,2, 5,6 y 6,05 o Tris-HCl 20 mM a pH 7,2. (aproximadamente 100 ul de medio IEX/tubo). 170 ul de rhASA 1: Se añadieron 10 en tampón de resp. al medio IEX con el mismo pH + para vaciar los tubos de referencia. Mezclar varias veces y dejar reposar durante aproximadamente 30 minutos. Centrifugar y medir la actividad en el sobrenadante.

50 Conclusión:

La rhASA se une como se esperaba al intercambiador catiónico, pero no al intercambiador aniónico. Incluso a pH 4,8, la rhASA se une fuertemente e inesperadamente a la resina. Esta unión se puede explicar por una fuerte polaridad o, como alternativa, por un cambio de dímero a octámero por debajo de pH 5,8, que induce cambios en los grupos cargados expuestos. Los resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo 3: Degradación de sulfátidos naturales en fibroblastos por rhASA

Experimento de dosis/respuesta:

60

Diseño experimental

65 Se cultivan los fibroblastos de un paciente de LDM con mutación nula (GM00243, adquirida en Coriell Cell Repository, EE.UU.) casi hasta la confluencia en matraces de 25 cm² con medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS). Las células se cargan con el sustrato natural, ¹⁴C-palmitoil sulfátido (15 μM). Después de la incubación durante 40 horas, el medio se cambia a medio que contiene rhASA (0, 25, 50 y 100 mU/ml de rhASA

purificada por afinidad, respectivamente). Después de 24 horas, las células se cosechan y los extractos de lípidos se preparan a partir de las células mediante una extracción en cloroformo-metanol. Las fracciones lipídicas se analizan mediante cromatografía TLC comparando con referencias marcadas radiactivamente. La placa de TLC se expone a una película de rayos X y las diferentes fracciones de lípidos de la placa de TLC se cuantifican usando recuento de centelleo líquido. Los datos se expresan como el porcentaje de radiactividad de los sulfátidos remanentes y metabolizados.

Resultados

Los datos de este experimento (Tabla 3 y Figura 4) muestran que todos los niveles de dosis de la rhASA utilizados (0,25, 2,5, 25, 50 y 100 mU/ml) metabolizan aproximadamente el 40–70 % de los ¹⁴C-sulfátidos marcados cargados en los fibroblastos de LDM. La degradación de fondo del sustrato es de aproximadamente el 15 % en las células no incubadas con rhASA. Este fondo puede explicarse por una baja actividad residual de las sulfatasas en las células de LDM, o alguna actividad sulfatasa del suero inactivado por calor, aunque no se puede detectar actividad DE ASA en las células o el FCS. Esto también puede explicar el metabolismo bajo en sulfátidos en las células de control en las que no se añade rhASA.

Tabla 7: Degradación de sulfátido radiomarcado en fibroblastos de DML con o sin la adición de arilsulfatasa A recombinante humana (rhASA). Los resultados se dan como el porcentaje de radiactividad recuperada en la fracción de lípidos celulares.

Experimento	A	B	Media	C	D	Media
Arilsulfatasa A añadida (mU/ml)	0	0		25	25	
Sulfátido metabolizado (%)		15,8	16,6	68,7	67,6	68,2
Sulfátido restante (%)	82,7	84,2	83,4		32,4	31,8
E	F	Media	G	H	Media	
50	50		100	100	50	
69,0	68,7	68,9	68,5	69,	68,8	
31,0	31,3	31,1	31,5	30,9	31,2	

Experimento del curso de tiempo:

Diseño experimental

Las células están cargadas ¹⁴C-palmitoil sulfátido (15 µM) como se ha descrito anteriormente. El medio se cambia a medio que contiene 25 mU/ml de rhASA purificada por afinidad y se cosecha a las 6, 24 y 48 horas. Los extractos de lípidos se preparan y se analizan como se ha descrito anteriormente. Los datos se expresan como el porcentaje de radiactividad de los sulfátidos remanentes y metabolizados.

Resultados

Los datos de este experimento ilustran que el metabolismo del sulfátido marcado con ¹⁴C cargado en los fibroblastos de LDM aumenta durante 48 horas después de la adición de la rhASA purificada por afinidad. Los datos se muestran en la figura 5.

Conclusión:

A partir de estos datos, se puede concluir que la rhASA es captada eficazmente por los fibroblastos de un paciente con LDM y que los sulfátidos cargados en estos fibroblastos pueden metabolizarse de manera eficaz por la rhASA exógena incluso a dosis bajas y, después de la incubación, durante unas pocas horas.

Ejemplo 4: Caracterización y uso de CHO-rhASA producido y purificado a gran escala

Caracterización de CHO-rhASA

La ASA humana se purificó a partir de secreciones de células de ovario de hámster chino (CHO) que sobreexpresan la ASA humana del plásmido de expresión pASAEsp1 (Zymenex A/S, Hillerød, Dinamarca–antiguo HemeBiotech A/S). La actividad específica de la preparación enzimática estaba por encima de 60 U/mg. La CHO-rhASA se volvió a tamponar en 1 × TBS a pH 7,4 a una concentración de 2,5-4,3 mg/ml y se analizó mediante SDS-PAGE y espectroscopia MALDI-TOF. Los espectros de masas MALDI se recogieron usando una estación de trabajo

Voyager-DE STR BioSpectrometry (Perspective Biosystems, Inc., Framingham, EE.UU.), equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Las mediciones se tomaron manualmente en modo de ion positivo lineal con una tensión de aceleración de 20-24 kV, una tensión de red del 90 % y una extracción de iones retardada de 200 ns. Cada espectro de masa obtenido fue la suma de 300 perfiles de láser no seleccionados en una preparación de muestra. Se usó ácido sinapínico como matriz. Para la desglucosilación parcial o completa de CHO-rhASA, se hizo reaccionar 1 µg de enzima con 1 o 500 mU de PNGasa F (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante 20 horas a 37 °C. El ensayo de endocitosis se realizó con 1 µg de CHO-rhASA por ml de medio durante 29 horas como se ha descrito (Matzner, U. et al. Gene Ther., 7, 805–812). La ASA se midió mediante un ELISA de tipo sándwich indirecto y un ensayo de actividad (Matzner U, et al. (2000) Gene Ther. 7(14):1250–7, Baum, H. et al. (1959). Clin. Chim. Acta., 4, 453–455).

Resultados

El análisis por SDS-PAGE y MALDI-TOF de las preparaciones de CHO-rhASA detectó un compuesto del tamaño correcto y la ausencia de contaminantes (Fig. 7A y 8A). La ASA humana de tipo silvestre tiene tres carbohidratos ligados a N con una masa molecular combinada de aproximadamente 5-6 kDa (Gieselmann, V. et al. (1992), J. Biol. Chem., 267, 13262–13266). El tratamiento con PNGasa F redujo la masa molecular aparente de CHO-rhASA, lo que indica la glucosilación de la enzima recombinante (Fig. 7A). Después de hacer reaccionar la CHO-rhASA con bajas concentraciones de PNGasa F, el análisis MALDI-TOF reveló cuatro intermedios de desglucosilación (Fig. 8B), que posiblemente representan el polipéptido ligado a tres, dos, uno y ninguno de los glicanos ligados a N. La diferencia de masa entre los productos con la masa más alta y la más baja está en el intervalo de 5 kDa, lo que sugiere una glucosilación completa de la enzima. Para evaluar la fosforilación de LA manosa de CHO-rhASA, la endocitosis dependiente de manosa 6-fosfato (M6P) de la enzima se evaluó mediante un ensayo de alimentación *in vitro*. El ensayo reveló una endocitosis eficiente de CHO-rhASA por las células BHK (Fig. 7B). Además, la captación podría estar completamente bloqueada por la M6P, pero no por la glucosa 6-fosfato. Se puede concluir que la CHO-rhASA contiene residuos de M6P.

Discusión

Los experimentos de cultivo celular revelaron que la CHO-rhASA porta restos de M6P y usa la ruta dependiente del receptor de M6P para la entrada en la célula (Fig. 7B). Las células BHK que se utilizaron en este ensayo *in vitro* no expresan otros receptores para enzimas lisosomales. Por lo tanto, es posible que otros receptores, tales como el receptor de manosa o el receptor de asialoglicoproteína, compitan por la unión y endocitosis de la CHO-rhASA sustituida en condiciones *in vivo*.

Ejemplo 6: Administración de rhASA humana recombinante a ratones deficientes en arilsulfatasa A.

Materiales y procedimientos

Se produjo arilsulfatasa A humana recombinante como se describe en el ejemplo 1. Los lotes de rhASA utilizados para los estudios en animales incluyeron G0301 (la concentración fue de 4 mg/ml y la actividad de la enzima fue de 166 U/ml) y G0302 (la concentración fue de 4,3 mg/ml y la actividad enzimática fue de 242 U/ml). La rhASA se almacenó a -20 °C. Antes del inicio del experimento, los lotes de enzimas se descongelaron y agruparon, y se analizaron el contenido de proteína y la actividad de la enzima. La rhASA en este grupo se diluyó con TBS, por lo que el volumen de inyección fue de 250-300 µl en todos los grupos de animales. Las diluciones se hicieron inmediatamente antes de la inyección. Se anotaron el peso corporal y el volumen de la dosis para cada animal.

Tratamiento de los ratones

Los ratones defectivos en ASA y los controles de tipo silvestre con el fondo genético mixto C57Bl/6J × 129 Ola (Hess B, et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA. 93(25):14821–6) se mantuvieron en condiciones de alojamiento estándar de conformidad con la legislación alemana vigente sobre protección de los animales. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité local de bienestar animal (Bezirksregierung Köln, número de referencia 50.203.2-BN 24, 18/04). Los experimentos se realizaron con animales de 8-12 meses de edad. Dependiendo del peso del animal y de la concentración de la reserva de CHO-rhASA, se administraron 200-300 µl de solución enzimática (CHO-rhASA en 1 x TBS a pH 7,4) mediante una inyección en bolo intravenoso en la vena de la cola. A los animales de control se les inyectó 250 µl de 1 x TBS a pH 7,4.

Análisis de ratones

Durante el período de tratamiento, se extrajo sangre de la vena de la cola. Para el análisis final, se administró anestesia profunda a los ratones se anestesiaron usando una inyección intraperitoneal de tribromoetanol y se perfundieron por vía transcardiaca. Para las investigaciones histológicas, los ratones se perfundieron primero con PBS y luego con glutaraldehído al 6 % en tampón fosfato 100 mM, a pH 7,4. A continuación, se diseccionaron los tejidos y se procesaron como se describe a continuación. Para los análisis bioquímicos, se perfundió a los ratones PBS solo. Los riñones, el hígado, el cerebro, el plexo braquial y los nervios ciáticos se diseccionaron, se pesaron y

se congelaron. Las muestras de tejido se homogeneizaron en 1 x TBS a pH 7,4. Se usaron alícuotas de los homogeneizados para la extracción de lípidos (véase a continuación), la determinación de proteínas (ensayo BioRad Dc, BioRad, Hercules, EE.UU.) y las mediciones de ASA mediante ELISA (9).

5 Análisis de los lípidos

Se centrifugaron alícuotas de homogeneizados tisulares (véase anteriormente) a 100.000 x g durante 1 hora y el sedimento se extrajo primero con 5 ml de cloroformo/metanol (C/M) a 2:1 (v/v) y, después, con 5 ml de C/M a 1:1 a 60 °C durante 4 horas en cada caso. Después de la evaporación del disolvente, los lípidos secos se redisolvieron en 5 ml de MeOH. La metanólisis alcalina se inició con 125 µl de NaOH 4 N a 37 °C y se detuvo después de 2 horas con 20 µl de ácido acético al 100 %. Los lípidos se secaron y se disolvieron en 1 ml de MeOH. Para la desalación mediante cromatografía de fase inversa, las columnas Lichroprep RP-18 (Merck, Darmstadt, Alemania) con un volumen de lecho de 1 ml se equilibraron con C/M/KCl 0,1 M 6:96:94. Después de añadir 1 volumen de acetato amónico 0,3 M a la solución lipídica, la mezcla se cargó en la columna. Después de lavar con 6 ml de H₂O, los lípidos se eluyeron con 1 ml de MeOH y, después, con 6 ml de C/M a 1:1. Se pulverizaron las alícuotas de los extractos lipídicos sobre placas de gel de sílice 60 (Merck) usando el muestreador TLC automático 4 de CAMAG (Muttentz, Suiza). Los volúmenes de carga se normalizaron en la concentración de proteína de los homogeneizados crudos utilizados para la extracción de lípidos. Se cargaron diferentes cantidades (0,5-8 µg) de patrones de lípidos (colesterol, esfingomielina, sulfátido, todos ellos patrones de Sigma) en calles separadas. Después de la cromatografía en capa fina (TLC) con C/M/H₂O a 70:30:4 como un sistema disolvente, los lípidos se visualizaron de acuerdo con Yao y Rastetter (33). Las placas se escanearon con un escáner de lecho plano (PowerLook III de UMAX Data Systems, Hsinchu, Taiwán) y se determinaron las intensidades de las bandas de lípidos con el software de análisis Aida 2.11 (Raytest, Straubenhardt, Alemania). Las cantidades de colesterol, esfingomielina y sulfátido se expresan como unidades arbitrarias que representan las intensidades de la banda de TLC respectiva después de la corrección de fondo. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student.

Histología

Los riñones, la médula espinal y el cerebro se disecaron de ratones fijados por perfusión. Para la detección de sulfátidos, se prepararon láminas de tejido (100 µm de espesor) con un vibratomo y se incubaron con azul alcian (Alcec Blue, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) como se ha descrito (Wittke, D. et al. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 108, 261-271). Las condiciones histoquímicas (pH 5,7, MgCl₂ 300 mM) fueron suficientes para justificar la tinción específica de sulfátidos (Scott, J.E. y Dorling, J. (1965), *Histochemie*, 5, 221-233). Se prepararon secciones de parafina a partir de bloques de riñón después de incubar antes de la inclusión con azul alcian. Las muestras de nervios ciáticos y de riñón se incluyeron en araldita según los procedimientos de rutina para preparar secciones semifinas, con o sin incrustación previa a la inclusión en azul alcian.

Resultados:

40 Farmacocinética y biodistribución de CHO-rhASA después de una dosificación única

Los ratones defectivos en ASA se trataron primero con una inyección única de CHO-rhASA en la vena de la cola. Para determinar la velocidad de aclaramiento de rhASA de la circulación, se analizaron los niveles plasmáticos de la enzima en diferentes momentos después de la infusión de 20 o 40 mg de enzima por kg de peso corporal (Fig. 9A). Para ambas dosis, los niveles plasmáticos alcanzaron un máximo en los primeros minutos después de la inyección y disminuyeron a partir de ese momento. Independientemente de la dosis administrada, la rhASA se aclaró del plasma con un semitiempo de aproximadamente 40 minutos. Para evaluar la cinética de la captación de tejido, se perfundió a los ratones en diferentes momentos después de la infusión y se analizaron varios órganos para determinar las concentraciones de rhASA. La inmunorreactividad para rhASA podría detectarse ya 10 minutos después de un único tratamiento con 40 mg/kg en todos los tejidos (Fig. 9B y C). En el hígado que adquirió la mayor concentración de enzima (véase a continuación), los niveles de enzima aumentaron aproximadamente 4 veces en las siguientes cinco horas y se redujeron después hasta el día 14 a aproximadamente un 4 % del nivel máximo (Fig. 9B). La cinética fue similar para el riñón, el nervio ciático y el cerebro (Fig. 9C). Independientemente de las diferencias entre las velocidades de captación específicas de tejido, la enzima se eliminó de todos los tejidos en un curso de tiempo comparable. Por lo tanto, la semivida de la rhASA inmunológicamente detectable en hígado, riñón, nervio ciático y cerebro varió en aproximadamente 4 días (Fig. 9B y C). Llama la atención que la concentración máxima de rhASA difiera en más de tres órdenes de magnitud entre el hígado y el cerebro 5 horas después de la infusión (Fig. 9B y C). Para analizar la biodistribución de la rhASA con más detalle, se infundió a los ratones defectivos en ASA con dosis crecientes de rhASA y los tejidos se analizaron 8 días después mediante ELISA. Podría detectarse un aumento aproximadamente lineal dependiente de la dosis de la concentración de enzima en riñones y nervios periféricos (Fig. 10A). La mayoría de la enzima infundida se encontró, sin embargo, en el hígado (mostrada para 20 mg/kg en la Fig. 10B). En comparación con el hígado, las concentraciones de rhASA fueron de aproximadamente un 7 % en el riñón, <0,05 % en el cerebro y del 12-15 % en el nervio ciático y el plexo braquial. Teniendo en cuenta las diferentes masas de estos tejidos, se puede calcular que aproximadamente el 97 % de la enzima recuperable se encontraba en el hígado, aproximadamente el 3 % en los riñones y por debajo del 0,1 % en el SNC y los nervios periféricos.

Reducción de los niveles de sulfátido después de una sola dosificación de CHO-rhASA

Para evaluar el potencial terapéutico del tratamiento con CHO-rhASA, se infundió a los ratones defectivos en ASA por vía intravenosa una sola dosis de 40 mg de CHO-rhASA por kg de peso corporal y se extrajeron los lípidos del riñón 8 días después. La TLC de los extractos de lípidos reveló una disminución importante de los niveles de sulfátido en comparación con los controles tratados de manera simulada (Fig. 11A). La dependencia del tiempo de la reducción de sulfátido se investigó en un segundo experimento. Para ese fin, se determinaron los niveles de sulfátido en los riñones en diferentes momentos después de la inyección de 40 mg/kg (Fig. 11B). El aclaramiento significativo de sulfátido podría detectarse ya 5 horas después de la infusión y el grado de reducción aumentó hasta el día 8. En ese momento, aproximadamente dos tercios del exceso de sulfátido se aclararon del riñón. Seis días después reapareció el sulfátido y el nivel medio residual de sulfátido aumentó aproximadamente en un 22 %. Para determinar la dependencia de la dosis de la reducción de sulfátidos, se trató a los ratones con diferentes dosis de CHO-rhASA y se analizaron 8 días después. Ya 10 mg/kg produjeron una disminución significativa del almacenamiento de sulfátido en el riñón (Fig. 11C). La extensión del aclaramiento de sulfátido aumentó con dosis crecientes y se pudo detectar una relación aproximadamente lineal entre la dosis y la pérdida de sulfátido.

Para evaluar los efectos del reemplazo enzimático sobre el catabolismo lipídico del sistema nervioso, también se analizaron el cerebro completo, el nervio ciático y el plexo braquial de los animales tratados de forma diferente. En comparación con el riñón, donde los niveles de sulfátido aumentaron alrededor de 10 veces en los ratones defectivos en ASA envejecidos (Fig. 11B y C), el sistema nervioso mostró solo una elevación aproximada de 2 veces de los niveles de sulfátido (Fig. 12A-C y Fig. 13B-D). La dosificación única con 40 mg/kg no tuvo ningún efecto sobre el almacenamiento de sulfátido en el cerebro (Fig. 12A). Sin embargo, se detectó una disminución significativa en el nervio ciático (Fig. 12B) y el plexo braquial (Fig. 12C) después de la administración de 40 mg/kg. Además, los niveles enzimáticos de 10 y 20 mg/kg redujeron el almacenamiento medio de sulfátido en los nervios periféricos, pero la diferencia para controlar los tejidos no fue estadísticamente significativa (Fig. 12B y C).

Reducción del almacenamiento de sulfátido después de la dosificación repetida de CHO-rhASA

La alta eficacia inesperada de dosis únicas de enzimas para reducir los niveles de sulfátido en tejidos periféricos proporcionó la justificación para evaluar el potencial terapéutico de las inyecciones repetidas. Los inventores eligieron un programa de tratamiento basado en hasta cuatro inyecciones de 20 mg de CHO-rhASA/kg una vez a la semana. Los niveles de sulfátido se analizaron 8 días después de la última inyección en riñón, nervios periféricos y cerebro de ratones tratados con una, dos, tres o cuatro inyecciones (Fig. 13).

La TLC reveló que el sulfátido disminuyó progresivamente con un número creciente de infusiones en todos los tejidos periféricos. Después del cuarto tratamiento, se eliminó el 65 % del exceso de sulfátido del riñón y del plexo braquial (Fig. 13A y D) y ~ 82 % del nervio ciático (Fig. 13C), respectivamente. En el cerebro no se detectó disminución de sulfátido después del primer, segundo y tercer tratamiento (Fig. 13B). Después del cuarto tratamiento, sin embargo, el nivel de sulfátido se redujo significativamente en un 13 % de media. Esto representa un aclaramiento del 30 % del exceso de sulfátido del cerebro.

Para verificar la reducción de sulfátido en el sistema nervioso central de los ratones tratados con cuatro inyecciones, se realizó un análisis histológico del cerebro y la médula espinal. En las sustancia blanca y gris del SNC de ratones defectivos tratados de forma simulada, el patrón de almacenamiento de sulfátido fue idéntico al patrón descrito previamente para ratones defectivos en ASA (Wittke, D. et al. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 108, 261–271) y se pueden distinguir dos tipos morfológicos de material de almacenamiento (Fig. 14). Depósitos grandes (> 20 µm) que son típicos de los fagocitos y las neuronas, y gránulos de almacenamiento pequeños característicos de la oligodendroglía (Fig. 14C y G). Los fagocitos se han identificado previamente como células microgliales activadas (Hess B, et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(25):14821–6). El almacenamiento en los fagocitos y las neuronas se puede distinguir por el aspecto menos compacto y con más forma de anillo del material alcianofílico de las neuronas (recuadro de la Fig. 14C). En el cerebro y la médula espinal de ratones tratados con rhASA, el sulfátido se aclaró en gran parte de los fagocitos tanto en la sustancia blanca como la gris (Fig. 14 A a H), mientras que la tinción de neuronas y oligodendrocitos permaneció inalterada y similar en ratones de forma simulada (mostrado para el cerebro en las Fig. 14D y H).

Además del sistema nervioso, el riñón también se analizó histológicamente. Los riñones de ratones tratados de forma simulada mostraron los mismos patrones de almacenamiento de sulfátido que se han descrito anteriormente (Lullmann-Rauch, R. et al. (2001), *Histochem. Cell Biol.*, 116, 161–169). El almacenamiento fue intenso en las ramas finas y las ramas ascendentes gruesas del asa de Henle y moderado en los túbulos contorneados distales y los túbulos colectores (Fig. 15). Después de cuatro inyecciones de enzima, el material de almacenamiento se aclaró casi por completo de los túbulos contorneados distales (Fig. 15J) y el almacenamiento se redujo claramente en las porciones superiores de las ramas ascendentes gruesas (Fig. 15G). Sin embargo, el almacenamiento en las ramas finas y los túbulos colectores persistió y se asemejó al de los ratones tratados de forma simulada (Fig. 15B a E).

El análisis del riñón también reveló un aumento significativo de 1,4 veces del peso húmedo del riñón en ratones defectivos en ASA de 9 meses de edad en comparación con los controles de tipo silvestre (datos no mostrados). Curiosamente, el reemplazo enzimático redujo y normalizó parcialmente el aumento del tamaño del riñón. El grado

de reducción fue estadísticamente significativo después del tercero y después del cuarto tratamiento (prueba t de Student, $p < 0,05$) y el peso del riñón disminuyó a 1,2 veces el normal después de cuatro inyecciones (no mostrado). En un segundo experimento independiente, el peso medio del riñón de los ratones defectivos de 12 meses de edad aumentó 1,5 veces en comparación con los ratones de tipo silvestre (no mostrado). Se redujo significativamente (prueba t de Student, $p < 0,05$) a 1,1 veces lo normal después de 4 inyecciones de enzima (no mostrado). El hígado y el cerebro se pesaron como controles y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales para estos órganos (no mostrado).

Discusión

Aproximadamente el 30 % de la cantidad total de rhASA inyectada podría recuperarse de órganos de ratón diseccionados 5 horas después de la inyección intravenosa de 40 mg/kg (no mostrado). Entre la fracción recuperable, más del 90 % se localizó en el hígado, mientras que el riñón y los nervios periféricos compartieron la gran mayoría de la enzima restante (Fig. 10B). Una comparación con datos previos sobre las actividades de ASA en ratones de tipo silvestre (Matzner U, et al. (2000) *Gene Ther.* 7(14): 1250–7) sugiere que los niveles de enzimas después del tratamiento con rhASA eran, de media ~ 95 veces (hígado), ~ 1,2 veces (riñón), ~ 0,6 veces (nervios periféricos) y ~ 0,001 veces (cerebro) de lo normal.

Ya una inyección intravenosa de rhASA condujo a una disminución pronunciada dependiente del tiempo y de la dosis del almacenamiento de sulfátido en los riñones y los nervios periféricos (Fig. 11). Esta es la primera prueba de que la TRE que usa ASA es eficaz para reducir el almacenamiento de sulfátido *in vivo*. Notablemente, ya 5 horas después de la inyección de 40 mg/kg, se detectó una disminución significativa del almacenamiento de sulfátido en el riñón (Fig. 11B). Ocho días después del tratamiento, el almacenamiento disminuyó a un mínimo y hasta el 70 % del exceso de sulfátido se había desvanecido del riñón (Fig. 11B) y de los nervios periféricos (Fig. 12B y C).

En comparación con los experimentos previos de terapia génica, en los que la TLC no reveló una disminución significativa de la concentración media de sulfátido en el riñón completo (Matzner U, et al (2002) *Gene Ther* 9(1):53–63), tanto la velocidad como la magnitud de la reducción de almacenamiento fueron sorprendentes. La diferencia entre los dos estudios es sorprendente, ya que el nivel de estado estable de hASA en el riñón, que se logró mediante trasplante, fue 1,3 veces mayor de lo normal de media y, por lo tanto, prácticamente igual al nivel máximo alcanzado con una inyección única de 40 mg de CHO- rhASA/kg (véase anteriormente). Por lo tanto, CHO-rhASA, que estaba presente en el riñón solo durante un par de días eliminó más de dos tercios del exceso de sulfátido, mientras que la misma cantidad de enzima no redujo el almacenamiento medio cuando se expresó de manera estable a partir de células del sistema hematopoyético durante casi un año. La dependencia de la eficacia terapéutica en el tipo de célula que expresa la enzima apunta a las diferencias específicas del tipo de célula en la biosíntesis de ASA humana. Los estudios de cultivo celular sugirieron que la ASA humana es fosforilada de manera ineficaz por las células del sistema hematopoyético, pero es fosforilada de manera eficiente por las células CHO y BHK (Muschol, N. et al. 2002, *Biochem. J.*, 368, 845–853, y Fig. 7B). No obstante, la fosforilación parece ser importante para la eficacia terapéutica en los ratones defectivos en ASA. De este modo, una fosforilación baja de la ASA humana por las células hematopoyéticas y una fosforilación alta por las células CHO pueden explicar el fracaso parcial de la terapia génica de células madre de médula ósea y el éxito de la terapia de reemplazo enzimático en ratones defectivos en ASA.

Los experimentos de una sola dosis indicaron que el aclaramiento del almacenamiento es solo transitorio y el sulfátido se vuelve a acumular en la segunda semana después del tratamiento (Fig. 11B). La reacumulación parcial del almacenamiento puede explicarse por la semivida limitada de la rhASA internalizada, que estaba en el intervalo de solo 4 días (9B y C). La reacumulación de sulfátido requirió un régimen basado en inyecciones repetidas de enzimas con el fin de mantener o incluso mejorar la reducción del almacenamiento a largo plazo. El tratamiento repetido con 20 mg de CHO-rhASA por kg dio como resultado una disminución escalonada del almacenamiento de sulfátido en los tejidos periféricos (Fig. 13A, C y D). Hasta un 65 % y un 82 % del exceso de sulfátido se pudo eliminar del riñón y de los nervios periféricos mediante cuatro inyecciones, respectivamente. El análisis histológico del riñón reveló la disminución más prominente del almacenamiento de sulfátido en la corteza (Fig. 15). En el presente documento, el almacenamiento se abolió o se redujo considerablemente en los túbulos contorneados distales y la parte superior de las ramas ascendentes gruesas del asa de Henle, respectivamente. En la actualidad, no está claro por qué estos segmentos de la nefrona responden más claramente a la TRE que otros segmentos. Posiblemente, la especificidad de la región está determinada por el patrón de expresión del receptor o los receptores que endocita la rhASA.

Sorprendentemente, la dosificación repetida no solo redujo el almacenamiento en los tejidos periféricos, sino también en el SNC. Esto se evidenció primero en la TLC de los lípidos cerebrales, que mostró una disminución del sulfátido en un 13 % después del cuarto tratamiento (figura 13B). Sin embargo, se observó más claramente la reducción del almacenamiento en el SNC en el análisis morfológico. La histología del cerebro y la médula espinal reveló una frecuencia sorprendentemente reducida de los fagocitos que almacenan sulfátido agrandados a lo largo del SNC (mostrado para el tronco encefálico en la Fig. 14). Por lo tanto, la reducción de los niveles de sulfátido en el SNC parece deberse principalmente al aclaramiento de los lípidos de estos fagocitos que representan las células microgliales activadas (Hess B, et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(25): 14821–6) en lugar de neuronas u

oligodendroglía. Recientemente, se ha demostrado en modelos animales para la enfermedad de Krabbe y Sandhoff que la activación de la microglía desempeña un papel importante en la patogenia de estas enfermedades de almacenamiento de esfingolípidos relacionadas (Matsushima, G.K. et al. (1994), *Cell*, 78, 645–656., Wada, R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10954–10959). La activación de la microglía también es prominente en ratones defectivos en ASA en el segundo año de vida (Hess B, et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA. 93(25): 14821-6). Por lo tanto, puede esperarse que la reducción del almacenamiento de sulfátidos en las células microgliales sea beneficiosa incluso en ausencia de un aclaramiento detectable de sulfátido de otras células de la glía y neuronas.

Como la barrera hematoencefálica impide la transferencia de rhASA de la circulación al SNC, el cerebro no adquirió niveles de enzima superiores al 0,1 % de lo normal durante el período de tratamiento de 4 semanas (Fig. 9C y 10B, y no se muestran), debido a las bajas concentraciones, la arilsulfatasa A presente en el SNC es poco probable que sea responsable de todo el aclaramiento observado de los sulfátidos de los fagocitos. Un segundo mecanismo que puede contribuir al aclaramiento implica la endocitosis de la enzima en los fagocitos antes de la inmigración al SNC. Sin embargo, se cree que la parte principal de la población de fagocitos del SNC (es decir, microglía) representa una población celular autorrenovadora autónoma derivada de progenitores de macrófagos que inmigraron al SNC en una etapa temprana de la vida y que son distintos de los monocitos/macrófagos de la sangre presentes en tejidos no neurales. Existe un tercer mecanismo contributivo, que implica la exportación de sulfátidos desde las células cerebrales a las células periféricas. La fuerza impulsora para esta exportación parece ser un desequilibrio creciente del equilibrio entre el almacenamiento de sulfátido en el SNC y los tejidos periféricos debido a la hidrólisis de sulfátido catalizada por ASA en la periferia.

Ejemplo 6: Estudios sobre parámetros neurológicos – Estudios en cilindro giratorio

Los ratones defectivos en ASA desarrollan alteraciones de la conducción nerviosa y una serie de síntomas neurológicos. Para medir los supuestos efectos terapéuticos sobre los parámetros neurológicos se examinó el rendimiento en el cilindro giratorio.

Las pruebas conductuales previas revelaron déficits progresivos de los ratones defectivos en ASA en el equilibrio sobre una barra que gira lentamente (D'Hooge, R. et al. *Brain Res.*, 907, 35–43, Matzner U, et al. (2002) *Gene Ther* 9(1): 53-63). Para determinar los efectos del tratamiento sobre la coordinación motora, se realizaron pruebas a los ratones antes de la primera y después de la tercera infusión de CHO-rhASA mediante experimentos en cilindro giratorio. En un primer estudio, se analizaron ratones de una media de edad de aproximadamente 9 meses. En la prueba antes del tratamiento, los ratones de tipo silvestre tuvieron éxito en 32 de 40 ensayos (80 %), mientras que los dos grupos de ratones defectivos en ASA (aún no tratados) tuvieron éxito en 22 de 40 (55 %) y 25 de 40 (63 %) ensayos (no se muestran). Por lo tanto, los datos confirmaron que los déficits de comportamiento de los ratones defectivos en ASA ya son detectables, pero aun comparativamente leves a los 9 meses de edad (D'Hooge, et al. *Brain Res.*, 907, 35–43). Después del tratamiento de un grupo de ratones defectivos con tres dosis semanales de 20 mg de CHO-rhASA/kg, los mismos tres grupos se volvieron a analizar aproximadamente ~ 4 semanas después. En comparación con la primera prueba, el éxito medio de los ratones tratados con rhASA mejoró en un 27 % y alcanzó un 82 %. En contraste con este grupo, el rendimiento medio de los controles de tipo silvestre y los tratados de forma simulada solo mejoró en un 10 % y un 5 %, respectivamente (Fig. 16B). Por lo tanto, mediante una combinación de tratamiento y entrenamiento, los ratones defectivos en ASA de 9 meses de edad adquirieron la capacidad de permanecer en el cilindro con una frecuencia mayor que los ratones silvestres no entrenados de la misma edad.

Para investigar los efectos sobre discapacidades de coordinación motora más avanzadas, se analizaron ratones de 12 meses (3 meses más viejos que los anteriores) en un segundo experimento. En este momento, los porcentajes de ratones con éxito antes del tratamiento fueron del 43 % (controles de tipo silvestre), el 18 % (defectivos en ASA destinados para el tratamiento simulado) y el 10 % (defectivos en ASA destinados al tratamiento con rhASA) de media (no se muestra). Después del tratamiento, el 65 % de los controles de tipo silvestre y el 13 % de los ratones defectivos en ASA tratados de forma simulada tuvieron éxito (Fig. 16C). El porcentaje medio de ratones defectivos tratados con rhASA, sin embargo, aumentó al 31 %. Por lo tanto, también en ratones de más edad con deficiencias progresivas de coordinación, la coordinación motora podría mejorarse sustancialmente mediante tres tratamientos con CHO-rhASA.

Ejemplo 7: Estudios sobre la velocidad de conducción motora nerviosa

Para medir adicionalmente los supuestos efectos terapéuticos sobre los parámetros neurológicos, se estudió la conducción nerviosa del potencial de acción motor compuesto (CMAP) de los nervios ciáticos con anestesia mediante procedimientos electrofisiológicos establecidos (Zielasek, J. et al. *Muscle Nerve*, 19, 946–952). En resumen, el potencial de acción motor compuesto (CMAP) se registró con dos electrodos de aguja en los músculos del pie después de la estimulación distal del nervio tibial en el tobillo y la estimulación proximal del nervio ciático en la escotadura ciática. El análisis estadístico se realizó usando la prueba t de Student.

Los estudios neurofisiológicos del nervio ciático se realizaron 6 días después del cuarto tratamiento de ratones de 12 meses de edad. Después de la estimulación distal, los animales de control de tipo silvestre de la misma edad mostraron un CMAP normal con una amplitud de $19,0 \pm 1,7$ mV (media \pm SD, n = 8), una latencia de $0,84 \pm 0,11$ ms

y una duración de $3,3 \pm 0,36$ ms (Fig. 16A y Fig. 17). Los animales con deficiencia en ASA tratados de forma simulada mostraron una respuesta motora menos compacta con una amplitud media significativamente reducida ($15,6 \pm 3,9$ mV, $p < 0,05$) y una mayor duración ($4,1 \pm 0,31$ ms, $p < 0,01$). La latencia media y la velocidad de conducción nerviosa fueron $0,81 \pm 0,09$ ms y $45,4 \pm 8,8$ m/s, respectivamente, y no significativamente diferentes de las de los ratones de tipo silvestre (Fig. 16A, Fig 17 y no se muestra). El tratamiento con CHO-rhASA dio como resultado un aumento de la amplitud a valores normales ($20,4 \pm 5,9$ mV, $p < 0,05$) y una disminución significativa de la duración ($3,8 \pm 0,35$ ms, $p < 0,05$). Por lo tanto, la alteración de la conducción del nervio ciático prácticamente se normalizó después del tratamiento con rhASA. Se obtuvieron datos similares después de la estimulación proximal y los datos se reprodujeron en un experimento independiente usando ratones de otra serie de tratamiento (no se muestra).

Determinación de los parámetros electrofisiológicos

Tabla 8: Datos brutos

	<i>motlat</i> <i>distal</i>	<i>duración</i>	<i>ampl</i> <i>distal</i>	<i>onda f</i>	<i>lat</i> <i>prox</i>	<i>dur</i> <i>prox</i>	<i>ampl</i> <i>prox</i>	<i>distancia</i>	<i>vel.</i> <i>cond.</i> <i>nerv.</i>
número de tipo silvestre									
43	0,84	3	19,7	4,88	1,48	2,9	17,9	24	37,50
44	1	3,6	21,6	5,72	1,6	2,9	19,7	24	40,00
40	0,96	2,9	*	5,48	1,52	3,2	*	26	46,43
37	0,88	3,7	17,4	6,04	1,6	3,2	15,8	26	36,11
45	0,68	2,9	19,8	5,2	1,36	3	16,5	26	38,24
39	0,76	3,2	19	5,68	1,44	3,2	15,9	25	36,76
38	0,76	3,8	16,3	6	1,4	3,3	13,8	25	39,06
media	0,84	3,30	17,40	5,57	1,49	3,10	15,41	25,14	39,16
SD	0,11	0,36	4,15	0,39	0,09	0,15	3,37	0,83	3,21
número def. en TBS									
6	0,76	39	10,3	5,68	1,36	3,1	6,9	25	41,67
4	0,84	4	11,3	5,64	1,44	3,3	11,7	24	40,00
2	1	4,3	12,4	5,32	1,4	nd	13,6	27	67,50
3	0,8	4,8	15,7	5,64	1,44	3,6	14,8	25	39,06
7	0,76	4	16,8	4,76	1,32	nd	11,7	25	44,64
1	0,84	4,2	17	5,48	1,36	nd	12,8	25	48,08
5	0,8	4	23	5,08	1,4	nd	18,1	26	43,33
8	0,68	3,7	18,1	5,04	1,32	nd	16,2	25	39,06
media	0,81	4,11	15,58	5,33	1,38	3,33	13,23	25,25	45,42
SD	0,09	0,31	3,89	0,32	0,04	0,21	3,16	0,83	8,83
número de def. en rhASA									
26	0,76	4,3	28,5	5,2	1,36	nd	24	25	41,67
11	0,84	4,3	25,3	5,88	1,36	nd	22,6	24	46,15
27	0,68	4	12,7	5,08	1,36	nd	12,9	26	38,24
18	0,8	3,6	22,2	5,16	1,32	nd	17,2	25	48,08
14	0,72	3,4	17,7	4,88	1,32	nd	17,1	26	43,33
30	0,68	3,5	16,8	4,68	1,24	nd	14,3	25	44,64
24	0,76	3,6	12,7	5	1,32	nd	11,4	27	48,21
25	0,84	3,5	27,5	5	1,44	nd	11,9	24	40,00
media	0,76	3,78	20,43	5,11	1,34	nd	16,43	25,25	43,79
SD	0,06	0,35	5,94	0,33	0,05	nd	4,46	0,97	3,43

* el ratón de tipo silvestre n.º 40 dio amplitudes bajas debido a problemas técnicos (ampl dist = 8,0; ampl prox = 8,3); nd – duración tras la estimulación proximal no determinable

Tabla 9: Evaluación estadística usando la prueba t de Student

Valores P		dml	duración	ampl distal	onda f	lat prox	dur prox	ampl prox	distancia	NLG
5	de tipo silvestre sin tratar frente a defectivos	0,2930	0,0004	0,0449	0,1203	0,0073	nd	0,0258	nd	0,0611
10	tratados de forma simulara defectivos	0,1149	0,0375	0,0461	0,1121	0,0745	nd	0,0720	nd	0,3282
15	tratados de forma simulara frente a defectivos									
20	tratados con rhASA									
gris—diferencia estadísticamente significativa (P <0,05)										

Resultados

- 25 - los siguientes cambios en el patrón electrofisiológico de los ratones defectivos son estadísticamente significativos (defectivos de tipo silvestre frente a los tratados de forma simulada):
 - la duración (de la amplitud después de la estimulación distal) se incrementa
 - la amplitud (altura) después de la estimulación distal disminuye
 - 30 • la latencia después de la estimulación proximal disminuye
 - la amplitud (altura) después de la estimulación proximal disminuye
- el tratamiento da como resultado los siguientes cambios estadísticamente significativos del patrón (defectivos tratados de forma simulada frente a defectivos tratados con rhASA)
 - 35 • la duración (de la amplitud después de la estimulación distal) disminuye hacia los valores normales
 - la amplitud (altura) después de la estimulación distal se incrementa hacia los valores normales

(1) La amplitud es el resultado (suma) de los potenciales axónicos individuales. Si todos los potenciales axónicos pasan el electrodo de registro en el mismo punto de tiempo, la amplitud sería corta y alta. Si los potenciales pasan en diferentes puntos de tiempo (porque algunos axones conducen rápido y otros lento), la amplitud sería amplia y baja. En comparación con los ratones de tipo silvestre, la amplitud de los ratones defectivos en ASA es más aplanada y extendida.

(2) Para la determinación de la velocidad de conductancia nerviosa se mide el tiempo entre la estimulación y el inicio de la amplitud. Este tiempo es prácticamente el mismo para los ratones defectivos y de tipo silvestre. Se puede concluir que los ratones defectivos poseen fibras nerviosas con una velocidad de conductancia normal.

De (1) y (2) se puede concluir que los ratones defectivos tienen fibras conductoras rápidas (velocidad de conductancia nerviosa normal), pero también una fracción sustancial de fibras cuya velocidad de conductancia es más o menos reducida (amplitud aplanada y extendida).

El tratamiento da como resultado una mejora significativa de la duración y la altura de la amplitud. Los registros del CMAP en el nervio ciático de los ratones defectivos en ASA no tratados sugirieron una conducción alterada de un subconjunto de fibras axonales. Esto estaba indicado por una amplitud significativamente más baja y más amplia en presencia de una velocidad de conducción nerviosa normal (Fig. 16A y Fig. 17). El tratamiento disminuyó la duración e incrementó la altura de la amplitud aplanada, lo que demuestra la anulación de los efectos inhibidores. Este efecto correctivo podría estar asociado con el papel crucial del sulfátido en la organización de las uniones axogliales paranodales y la agrupación correcta de los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje a lo largo de la axolema. La posibilidad de revertir los cambios del CMAP mediante una exposición comparativamente corta a la enzima recombinante podría tener grandes implicaciones para el tratamiento de la LDM. Dado que los síntomas de PNS prevalecen antes de la etapa final de la LDM, la TRE podría retrasar sustancialmente la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida. Esta idea es apoyada por los datos en el cilindro giratorio en ratones, que indican una mejora de la coordinación motora tanto en una etapa temprana como en una etapa más avanzada de la enfermedad (Fig. 16B y C).

REFERENCIAS

- Baum, H., Dodgson, K.S. y Spencer, B. (1959) The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clin. Chim. Acta.*, 4, 453–455.
- 5 Coenen, R., Gieselmann, V. y Lullmann–Rauch, R. (2001) Morphological alterations in the inner ear of the arylsulfatase A–deficient mouse. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 101, 491–498.
- Dafang, W y Paradrige W.M. Neuroprotection with non–invasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, 254–259
- 10 Demeule M, Poirier J, Jodoin J, Bertrand Y, Desrosiers RR, Dagenais C, Nguyen T, Lanthier J, Gabathuler R, Kennard M, Jefferies WA, Karkan D, Tsai S, Fenart I, Cecchelli R, Beliveau R. High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood–brain barrier. *J Neurochem* 2002, 83, 924–33
- D'Hooge, R., Van Dam, D., Franck, F., Gieselmann, V. y De Deyn, PP. (2001) Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Brain Res.*, 907, 35–43.
- 15 Dierks T, Schmidt B, von Figura K. 1997. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22):11963–11968.
- Dunican DJ, Doherty P. Designing cell–permeant phosphopeptides to modulate intracellular signaling pathways. *Biopolymers.* 2001;60(1):45–60.
- 20 Gieselmann, V., Matzner, U., Hess, B., Lullmann–Rauch, R., Coenen, R., Hartmann, D., D'Hooge, R., DeDeyn, P. y Nagels, G. (1989) Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 21, 564–574.
- 25 Gieselmann, V., Franken, S., Klein, D., Månsson, J.E., Sandhoff, R., Lullmann–Rauch, R., Hartmann, D., Saravanan, V.P., De Deyn, P.P., D'Hooge, R., et al. (2003) Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. *Acta Paediatr. Suppl.*, 92, 74–79.
- 30 Gieselmann, V., Schmidt, B. y von Figura K. (1992) In vitro mutagenesis of potential N–glycosylation sites of arylsulfatase A. Effects on glycosylation, phosphorylation, and intracellular sorting. *J. Biol. Chem.*, 267, 13262–13266.
- Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lullmann–Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(25): 14821–6.
- 35 Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, Waksman G, Dowdy SF. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):474–7.
- Kakkis, E (2003) 9º Congreso Internacional en errores congénitos del metabolismo, 3 de septiembre, Brisbane, Australia.
- 40 Kudoh T, Wenger D.A. Diagnosis of metachromatic leukodystrophy, Krabbe disease, and Farber disease after uptake of fatty acid–labeled cerebroside sulfate into cultured skin fibroblasts. *J Clin Invest.* 1982 Jul;70(1):89–97.
- Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell–penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Mar;21(3):99–103.
- Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K, Saengen W. Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry.* 1998 Mar 17;37(11):3654–64.
- 45 Lullmann–Rauch, R., Matzner, U., Franken, S., Hartmann, D. y Gieselmann, V. (2001) Lysosomal sulfoglycolipid storage in the kidneys of mice deficient for arylsulfatase A (ASA) and of double–knockout mice deficient for ASA and galactosylceramide synthase. *Histochem. Cell Biol.*, 116, 161–169.
- 50 Matsushima, G.K., Taniike, M., Glimcher, I.H., Grusby, M.J., Frelinger, J.A., Suzuki, K. y Ting, J.P. (1994) Absence of MHC class II molecules reduces CNS demyelination, microglial/macrophage infiltration, and twitching in murine globoid cell leukodystrophy. *Cell*, 78, 645–656.
- Matzner U, Hartmann D, Lullmann–Rauch R, Coenen R, Rotherth F, Mansson JE, Fredman P, D'Hooge R, De Deyn PP, Gieselmann V. (2002) *Gene Ther* 9(1):53–63
- Matzner U, Harzer K, Learish RD, Barranger JA, Gieselmann V. (2000b) *Gene Ther.* 7(14):1250–7
- 55 Matzner, U., Habetha, M. y Gieselmann, V. (2000) Retrovirally expressed human arylsulfatase A corrects the metabolic defect of arylsulfatase A–deficient mouse cells. *Gene Ther.*, 7, 805–812.
- Muschol, N., Matzner, U., Tiede, S., Gieselmann, V., Ullrich, K. y Bräulke, T. (2002) Secretion of phosphomannosyl–deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. *Biochem. J.*, 368, 845–853.
- 60 Pan W, Kastin AJ. TNF–alpha transport across the blood–brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol.* 2002 Apr;174(2):193–200
- Pan W, Kastin AJ. Upregulation of the transport system for TNFalpha at the blood–brain barrier. *Arch Physiol Biochem.* 2001 Oct; 109(4):350–3.
- Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)

Rodman TC, Lutton JD, Jiang S, Al-Kouatly HB, Winston R. Circulating natural IgM antibodies and their corresponding human cord blood cell-derived Mabs specifically combat the Tat protein of HIV. *Exp Hematol.* 2001 Aug;29(8): 1004-9.

5 Rothenberger S, Food MR, Gabathuler R, Kennard ML, Yamada T, Yasuhara O, McGeer PL, Jefferies WA. Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium. *Brain Res.* 1996, 712, 117-21

Sandhoff R, Hepbaldikler ST, Jennemann R, Geyer R, Gieselmann V, Proia RL, Wiegandt H, Grone HJ J (2002) *Biol Chem* 277(23):20386-98

10 Schmidt, B, Selmer, T, Ingendoh, A, von Figura, K. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell.* 1995 Jul 28;82(2):271-8

Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol.* 2000 Jul; 10(7) :290-5.

Scott, J.E. y Dorling, J. (1965) Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochemie*, 5, 221-233.

15 Selmer T, Hallmann A, Schmidt B, Sumper M, von Figura K. 1996. The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in arylsulfatase from *Volvox carteri*. *Eur J Biochem* 238:341-345.

Sommeriade, HJ., Hille-Rehfeld, A., von Figura, Gisselmann, K. Four monoclonal antibodies inhibit the recognition of aryl sulfatase A by the lysosomal enzyme phosphotransferase. *Biochem J.* 1994 Jan 1;297 (Pt 1) : 123-30.

20 Wada, R., Tiffit, C.J. y Proia, R.L. (2000) Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 10954-10959.

25 Wittke, D., Hartmann, D., Gieselmann, V. y Lullmann-Rauch, R. (2004) Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 108, 261-271.

Yao, J.K. y Rastetter, G.M. (1985) Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.*, 150, 111-116.

30 Zielasek, J., Martini, R. y Toyka, K.V. (1996) Functional abnormalities in PO-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve*, 19, 946-952.

35

40

45

50

55

60

65

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Fogh, Jens
 Irani, Meher
 Andersson, Claes
 Weigelt, Cecilia
 Christer Möller
 10 Pia Hydén

15 <120> PRODUCCION Y PURIFICACION DE ARIL
 SULFATASA A

<130> 33686PC01
 <150> PA200400144
 <151> 2004-01-30
 20 <150> US 60/540.061
 <151> 2004-01-30
 <160> 4

25 <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1
 <211> 1524
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 30

<400> 1
 atggggggcac cgcggtccct cctcctggcc ctggtgctg gcctggccgt tgcacgtccg 60
 cccaacatcg tgetgatctt tgccgacgac ctcggtatg gggacctggg ctgctatggg 120
 caccacagct ctaccactcc caacctggac cagctggcgg cgggagggtc gcggttcaca 180
 35 gacttctacg tgctgtgtc tctgtgcaca cctctaggg ccgcccctct gaccggcccg 240
 ctccegggtc ggatgggcat gtaccctggc gtccctggtc ccagctccc ggggggctg 300
 cccctggagg aggtgaccgt ggccgaagtc ctggctgccc gaggctacct cacaggaatg 360
 gccggcaagt ggcaccttgg ggtggggcct gagggggct tctgcccc ccatcagggc 420
 ttccatcgat ttctaggcat cccgtactcc cagcaccagg gccctgcca gaacctgacc 480
 40 tgcttcccgc cggccactcc ttgcgacggg ggctgtgacc agggcctggt ccccatccca 540
 ctggtggcca acctgtccgt ggaggcgcag cccccctggc tgcccggact agaggcccgc 600
 tacatggctt tcgcccata cctcatggcc gacgcccagc gccaggtatg ccccttctc 660
 ctgtactatg cctctacca caccactac cctcagttca gtgggcagag ctttgagag 720
 cgttcaggcc gcgggccatt tggggactcc ctgatggagc tggatgcagc tgtggggacc 780
 45 ctgatgacag ccatagggga cctggggctg cttgaagaga cgctggtcat cttcactgca 840
 gacaatggac ctgagaccat gcgtatgtcc cgaggcggct gctccggtct cttgcggtgt 900
 ggaaaggaa cgacctacga gggcgggtgc cgagagcctg ccttggcctt ctggccaggt 960
 catatcgctc ccggcgtgac ccacgagctg gccagctccc tggacctgct gcctaccctg1020
 gcagccctgg ctggggcccc actgcccact gtcaaccttg atggctttga cctcagcccc1080
 50 ctgctgctgg gcacaggcaa gagccctcgg cagtctctct tcttctaccg gtcctaccca1140
 gacgaggtcc gtggggtttt tgctgtgcgg actggaaagt acaaggctca cttcttcacc1200
 cagggctctg cccacagtga taccactgca gacctgcct gccacgcctc cagctctctg1260
 actgctcatg agccccgct gctctatgac ctgtccaagg accctggtga gaactacaac1320
 ctgctggggg gtgtggcgg ggccacccca gaggtgctgc aagccctgaa acagcttcag1380
 55 ctgctcaagg cccagttaga cgcagctgtg accttcggcc ccagccaggt ggccccggggc1440
 gaggaccccg cctcgagat ctgctgtcat cctggctgca cccccgccc agcttgctgc1500
 cattgcccag atccccatgc ctga 1524

<210> 2
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 60

<400> 2

65 Met Gly Ala Pro Arg Ser Leu Leu Leu Ala Leu Ala Ala Gly Leu Ala

ES 2 687 671 T3

	1			5				10					15			
	Val	Ala	Arg	Pro	Pro	Asn	Ile	Val	Leu	Ile	Phe	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly
				20					25				30			
5	Tyr	Gly	Asp	Leu	Gly	Cys	Tyr	Gly	His	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Asn
			35					40					45			
	Leu	Asp	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Arg	Phe	Thr	Asp	Phe	Tyr	Val
			50				55					60				
	Pro	Val	Ser	Leu	Cys	Thr	Pro	Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg
			65			70					75					80
10	Leu	Pro	Val	Arg	Met	Gly	Met	Tyr	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Pro	Ser	Ser
					85					90					95	
	Arg	Gly	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Val	Ala	Glu	Val	Leu	Ala
				100					105					110		
15	Ala	Arg	Gly	Tyr	Leu	Thr	Gly	Met	Ala	Gly	Lys	Trp	His	Leu	Gly	Val
			115				120						125			
	Gly	Pro	Glu	Gly	Ala	Phe	Leu	Pro	Pro	His	Gln	Gly	Phe	His	Arg	Phe
			130				135					140				
	Leu	Gly	Ile	Pro	Tyr	Ser	His	Asp	Gln	Gly	Pro	Cys	Gln	Asn	Leu	Thr
			145			150					155					160
20	Cys	Phe	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Cys	Asp	Gly	Gly	Cys	Asp	Gln	Gly	Leu
					165					170					175	
	Val	Pro	Ile	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Val	Glu	Ala	Gln	Pro	Pro
				180					185					190		
25	Trp	Leu	Pro	Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Tyr	Met	Ala	Phe	Ala	His	Asp	Leu
			195					200						205		
	Met	Ala	Asp	Ala	Gln	Arg	Gln	Asp	Arg	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Tyr	Ala
			210				215					220				
	Ser	His	His	Thr	His	Tyr	Pro	Gln	Phe	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Ala	Glu
			225			230					235					240
30	Arg	Ser	Gly	Arg	Gly	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Leu	Met	Glu	Leu	Asp	Ala
					245				250						255	
	Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Ile	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu	Leu	Glu
				260					265					270		
35	Glu	Thr	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly	Pro	Glu	Thr	Met	Arg
				275				280					285			
	Met	Ser	Arg	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Cys	Gly	Lys	Gly	Thr
			290				295					300				
	Thr	Tyr	Glu	Gly	Gly	Val	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Phe	Trp	Pro	Gly
			305			310					315					320
40	His	Ile	Ala	Pro	Gly	Val	Thr	His	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu
					325					330					335	
	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Asn	Val	Thr
				340					345					350		
45	Leu	Asp	Gly	Phe	Asp	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser
			355					360					365			
	Pro	Arg	Gln	Ser	Leu	Phe	Phe	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Val	Arg
			370				375					380				
	Gly	Val	Phe	Ala	Val	Arg	Thr	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ala	His	Phe	Phe	Thr
			385			390					395					400
50	Gln	Gly	Ser	Ala	His	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Cys	His	Ala
					405					410					415	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	His	Glu	Pro	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser
				420					425					430		
55	Lys	Asp	Pro	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Ala
			435				440						445			
	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Lys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Lys	Ala
			450				455					460				
	Gln	Leu	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Gly
60			465			470						475				480
	Glu	Asp	Pro	Ala	Leu	Gln	Ile	Cys	Cys	His	Pro	Gly	Cys	Thr	Pro	Arg
					485					490						495
	Pro	Ala	Cys	Cys	His	Cys	Pro	Asp	Pro	His	Ala					
				500					505							
65																

<210> 3
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5

<220
 <221> FORMILACIÓN
 <222> 51
 <223> C-alfa Formilglicina

10

<400> 3

	Arg	Pro	Pro	Asn	Ile	Val	Leu	Ile	Phe	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	Tyr	Gly
	1				5					10					15	
15	Asp	Leu	Gly	Cys	Tyr	Gly	His	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Pro	Asn	Leu	Asp
				20					25					30		
	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Arg	Phe	Thr	Asp	Phe	Tyr	Val	Pro	Val
			35					40					45			
20	Ser	Leu	Xaa	Thr	Pro	Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Leu	Pro
		50					55					60				
	Val	Arg	Met	Gly	Met	Tyr	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Gly
	65					70					75					80
	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Thr	Val	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Ala	Arg
					85					90					95	
25	Gly	Tyr	Leu	Thr	Gly	Met	Ala	Gly	Lys	Trp	His	Leu	Gly	Val	Gly	Pro
				100					105					110		
	Glu	Gly	Ala	Phe	Leu	Pro	Pro	His	Gln	Gly	Phe	His	Arg	Phe	Leu	Gly
			115					120					125			
30	Ile	Pro	Tyr	Ser	His	Asp	Gln	Gly	Pro	Cys	Gln	Asn	Leu	Thr	Cys	Phe
		130					135					140				
	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Cys	Asp	Gly	Gly	Cys	Asp	Gln	Gly	Leu	Val	Pro
	145					150					155					160
	Ile	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Val	Glu	Ala	Gln	Pro	Pro	Trp	Leu
					165					170					175	
35	Pro	Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Tyr	Met	Ala	Phe	Ala	His	Asp	Leu	Met	Ala
				180					185					190		
	Asp	Ala	Gln	Arg	Gln	Asp	Arg	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ser	His
			195					200					205			
40	His	Thr	His	Tyr	Pro	Gln	Phe	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Ala	Glu	Arg	Ser
		210					215					220				
	Gly	Arg	Gly	Pro	Phe	Gly	Asp	Ser	Leu	Met	Glu	Leu	Asp	Ala	Ala	Val
	225					230					235					240
	Gly	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Ile	Gly	Asp	Leu	Gly	Leu	Leu	Glu	Glu	Thr
					245					250					255	
45	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ala	Asp	Asn	Gly	Pro	Glu	Thr	Met	Arg	Met	Ser
				260					265					270		
	Arg	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Leu	Leu	Arg	Cys	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr
				275				280					285			
50	Glu	Gly	Gly	Val	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Phe	Trp	Pro	Gly	His	Ile
		290					295					300				
	Ala	Pro	Gly	Val	Thr	His	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu	Leu	Pro
	305					310					315					320
	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Asn	Val	Thr	Leu	Asp
					325					330					335	
55	Gly	Phe	Asp	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser	Pro	Arg
				340					345					350		
	Gln	Ser	Leu	Phe	Phe	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Val	Arg	Gly	Val
				355				360					365			
60	Phe	Ala	Val	Arg	Thr	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ala	His	Phe	Phe	Thr	Gln	Gly
		370					375					380				
	Ser	Ala	His	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Pro	Ala	Cys	His	Ala	Ser	Ser
	385					390					395					400
	Ser	Leu	Thr	Ala	His	Glu	Pro	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	Lys	Asp
					405					410					415	
65	Pro	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro
				420					425					430		

ES 2 687 671 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Glu	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Lys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu
		435					440					445			
Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Glu	Asp
	450					455					460				
Pro	Ala	Leu	Gln	Ile	Cys	Cys	His	Pro	Gly	Cys	Thr	Pro	Arg	Pro	Ala
465					470					475					480
Cys	Cys	His	Cys	Pro	Asp	Pro	His	Ala							
				485											

<210> 4
<211> 489
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 4

1 Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Gly
 5 Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn Leu Asp
 Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val Pro Val
 Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg Leu Pro
 10 Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly
 65 Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg
 Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val Gly Pro
 15 Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe Leu Gly
 115 Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr Cys Phe
 130 Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu Val Pro
 145 Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro Trp Leu
 165 Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu Met Ala
 180 Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala Ser His
 195 His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu Arg Ser
 210 Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Ala Val
 225 Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Thr
 245 Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg Met Ser
 260 Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr Thr Tyr
 275 Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly His Ile
 290 Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu Leu Pro
 305 Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr Leu Asp
 325 Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser Pro Arg
 340 Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg Gly Val
 355 Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr Gln Gly
 370 Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala Ser Ser

50
55
60
65

ES 2 687 671 T3

	385					390					395				400	
	Ser	Leu	Thr	Ala	His	Glu	Pro	Pro	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ser	Lys	Asp
					405					410					415	
5	Pro	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro
				420					425					430		
	Glu	Val	Leu	Gln	Ala	Leu	Lys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu
			435					440					445			
	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Glu	Asp
		450					455					460				
10	Pro	Ala	Leu	Gln	Ile	Cys	Cys	His	Pro	Gly	Cys	Thr	Pro	Arg	Pro	Ala
	465					470					475					480
	Cys	Cys	His	Cys	Pro	Asp	Pro	His	Ala							
				485												

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de arilsulfatasa A recombinante que comprende una cantidad eficaz de una glicofoma de arilsulfatasa A recombinante, que comprende una cantidad de manosa-6-fosfato expuesta que permite la endocitosis eficiente de la arilsulfatasa recombinante A *in vivo* a través de la ruta de la manosa-6-fosfato para su uso en la reducción de los niveles de galactosil sulfátido dentro de las células dentro del sistema nervioso central en un sujeto que padece y/o se le ha diagnosticado leucodistrofia metacromática, en la que la formulación no comprende ninguno de los siguientes:
- a) un vehículo para la administración de arilsulfatasa A recombinante en el sistema nervioso central,
 - b) un componente capaz de causar la apertura o la interrupción de la barrera hematoencefálica, y
 - c) una célula intacta,
- en la que la formulación es adecuada para administración sistémica.
2. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la formulación es adecuada para administración intravenosa.
3. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la formulación se administra diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente, preferentemente en la que la formulación se administra cada dos semanas.
4. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la arilsulfatasa A recombinante tiene una actividad específica de al menos 20 U/mg, preferentemente de al menos 50 U/mg, más preferentemente de al menos 100 U/mg.
5. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación se administra a una dosis de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal.
6. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación se administra a una dosis de 0,25 a 50 mg/kg de peso corporal.
7. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación se administra a una dosis de 1 a 25 mg/kg de peso corporal.
8. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la arilsulfatasa A recombinante se formula en una solución isotónica.
9. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación se administra mediante inyección intravenosa como un suplemento del trasplante de médula ósea.
10. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación reduce los niveles de galactosil sulfátido en las células dentro del sistema nervioso central seleccionadas del grupo que consiste en fagocitos, células microgliales activadas, neuronas y oligodendroglía, más preferentemente en la que la formulación reduce los niveles de galactosil sulfátido en las células del sistema nervioso central localizadas dentro de la sustancia blanca o la sustancia gris dentro de una cualquiera de las regiones seleccionadas del grupo que consiste en médula espinal, tronco encefálico, cerebelo, núcleos del prosencéfalo y corteza cerebral.
11. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la arilsulfatasa A recombinante es endocitada eficazmente *in vivo* en las células diana dentro de un tejido seleccionado del grupo que consiste en hígado, riñón, bazo y corazón.
12. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia de aminoácidos de la arilsulfatasa A recombinante se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 - (b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A humana recombinante; y
 - (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A humana recombinante.
13. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la secuencia de aminoácidos de la arilsulfatasa A recombinante es idéntica al menos en un 95 % a la SEQ ID NO: 3.

14. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la secuencia de aminoácidos de la arilsulfatasa A recombinante es idéntica al menos en un 98 % a la SEQ ID NO: 3.

5 15. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación es adecuada para la administración a un sujeto que no recibe ningún tratamiento médico adicional para reducir los niveles de galactosil sulfátido, que comprende:

- 10 a) la administración de una composición que comprende un vehículo para la administración de arilsulfatasa A en el sistema nervioso central,
b) la administración de una composición capaz de la causar apertura o interrupción de la barrera hematoencefálica, y
c) la administración de una célula intacta.

15 16. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la arilsulfatasa A recombinante se produce en un sistema de cultivo celular continuo, comprendiendo el proceso:

- 20 i) cultivar una célula de mamífero capaz de producir arilsulfatasa A recombinante en medio líquido en un sistema que comprende uno o más biorreactores; y
ii) concentrar, purificar y formular la arilsulfatasa A recombinante mediante un proceso de purificación que comprende una o más etapas de cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico; en el que el proceso de ii) comprende las siguientes etapas:

- 25 a) poner en contacto un sobrenadante que contiene arilsulfatasa A recombinante en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen arilsulfatasa A recombinante;
b) cargar la fracción o fracciones de la etapa a) en otra columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen arilsulfatasa A recombinante;
c) intercambiar el tampón de la arilsulfatasa A recombinante presente en la fracción o fracciones de la etapa b) mediante filtración de flujo tangencial;
30 d) pulir la preparación de arilsulfatasa A recombinante de la etapa c) en una o dos o más etapas sucesivas, comprendiendo cada etapa cargar la preparación en una columna de cromatografía equilibrada y eluir una o más fracciones que contienen arilsulfatasa A recombinante;
e) pasar la fracción o fracciones de la etapa d) a través de un filtro de reducción viral;
f) formular la fracción o fracciones de la etapa e) para obtener una preparación de arilsulfatasa A recombinante en un tampón de formulación adecuado; y
35 g) cargar opcionalmente la preparación formulada de arilsulfatasa A recombinante en un recipiente adecuado y liofilizar la muestra.

40 17. La formulación para su uso de la reivindicación 16, en la que la célula de mamífero comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica:

- (a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
(b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A humana recombinante; o
45 (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y que, al mismo tiempo, comprende una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A humana recombinante.

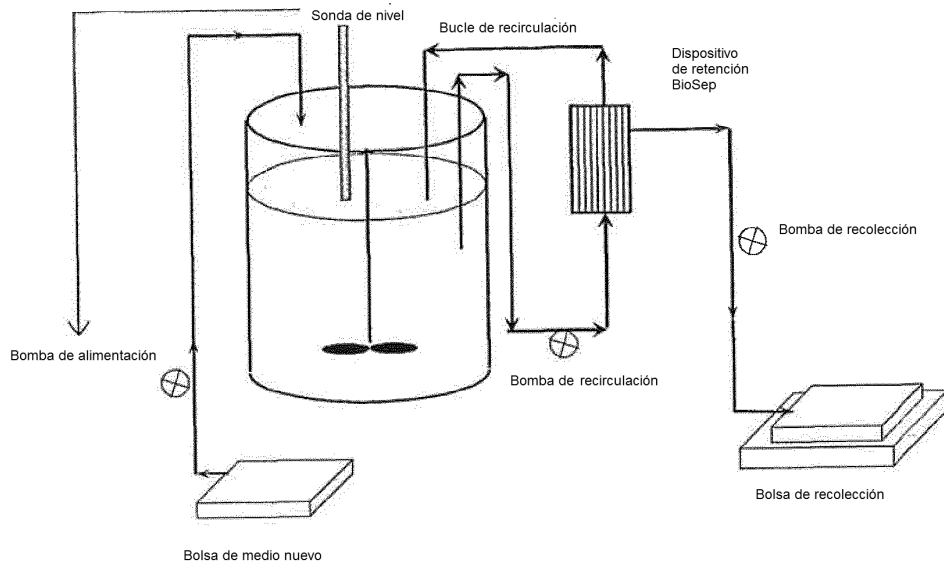
50

55

60

65

A



B

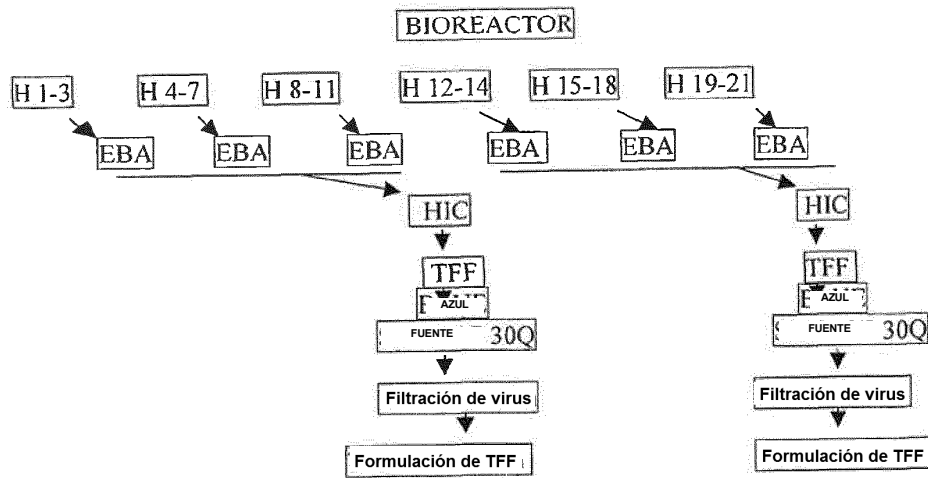


Fig. 1

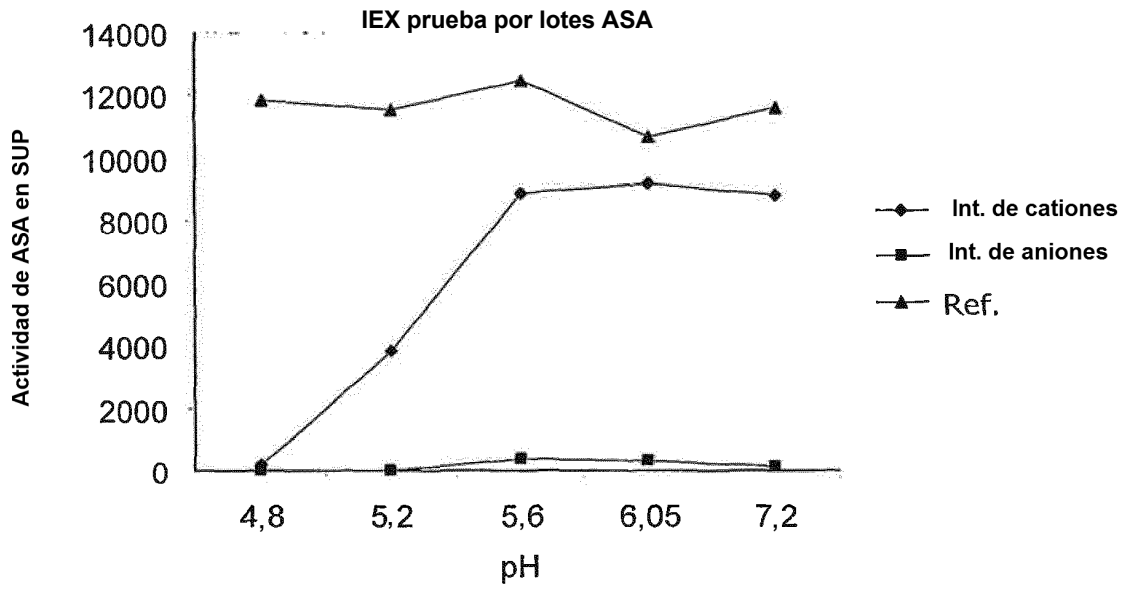


Fig. 2

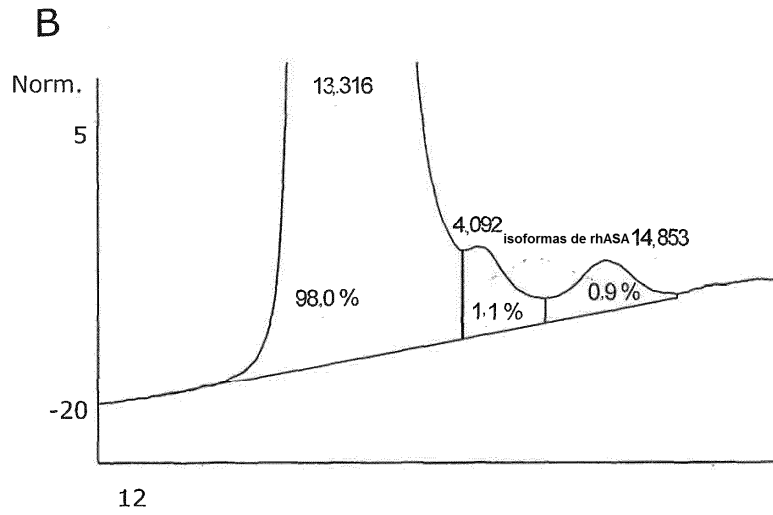
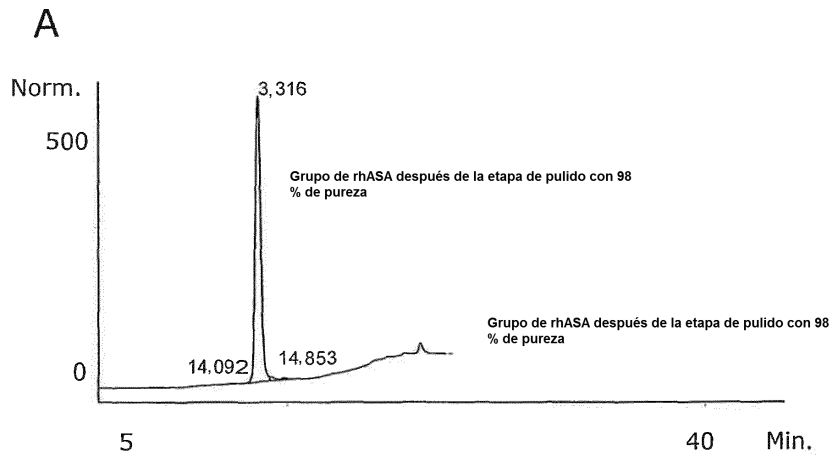


Fig. 3

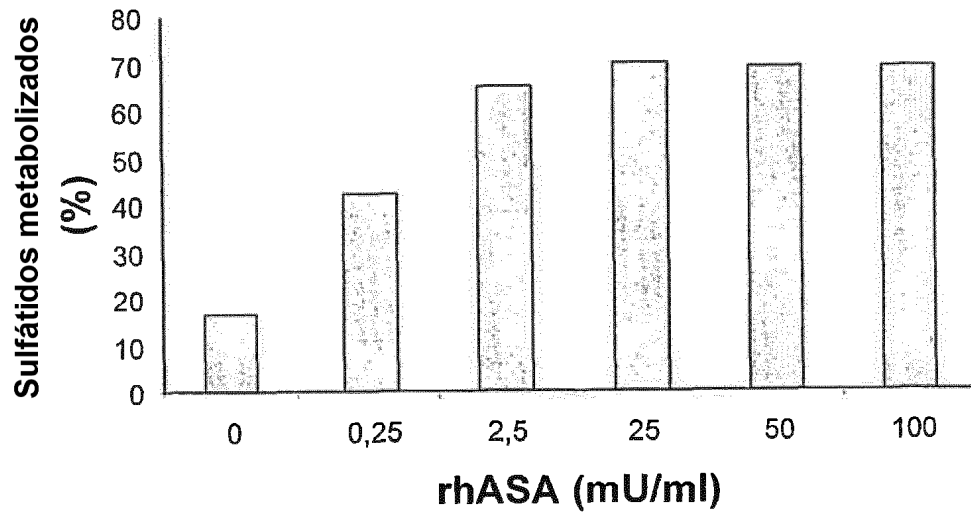


Fig. 4

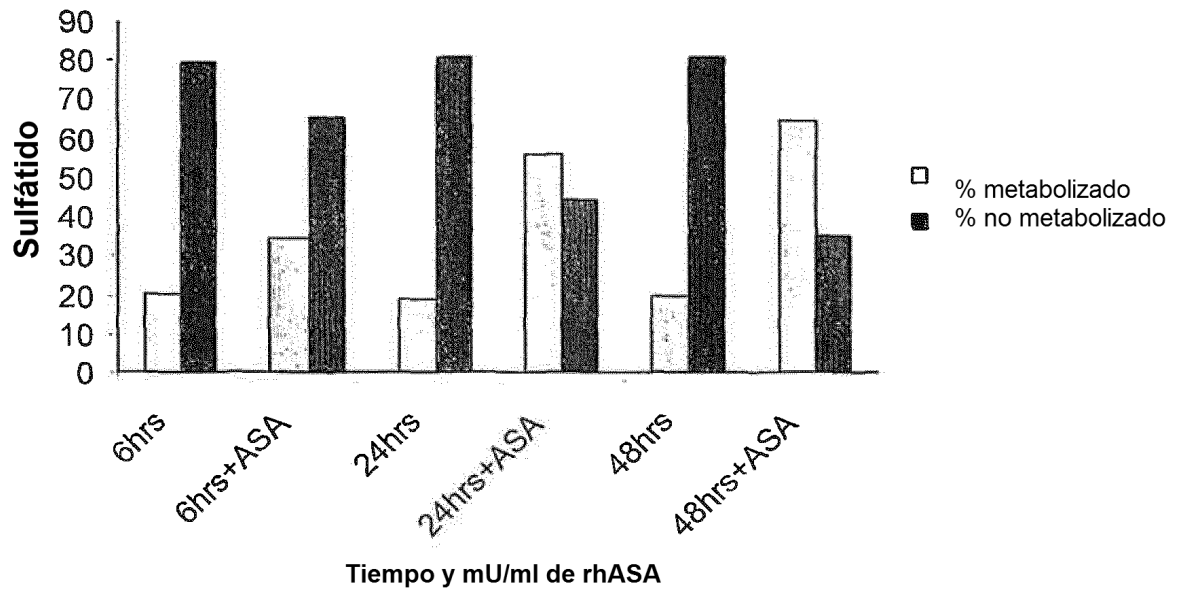


Fig. 5

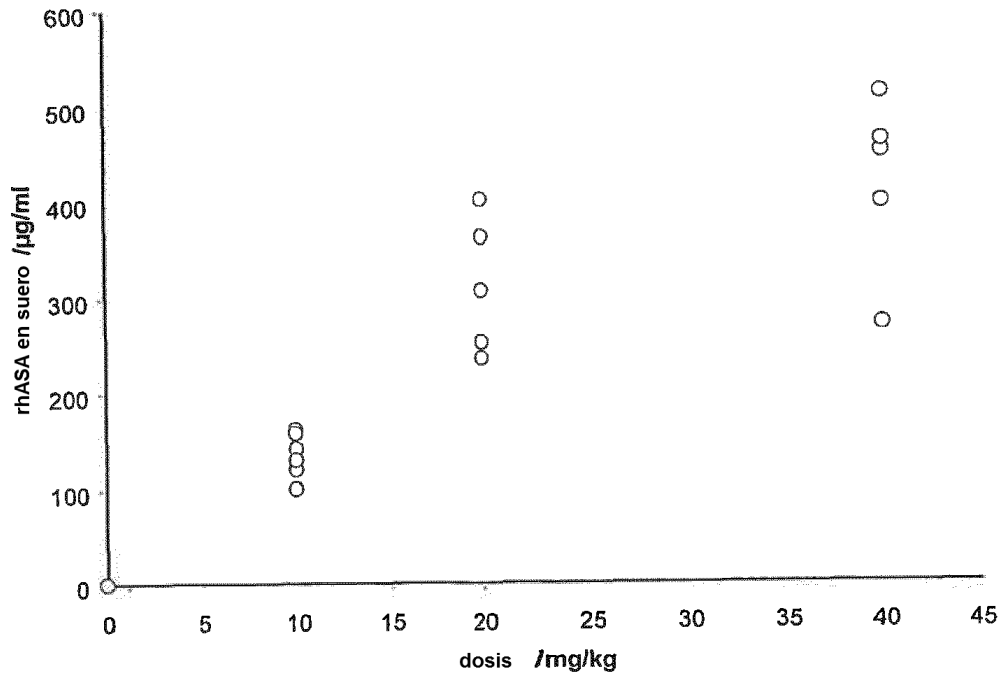


Fig. 6

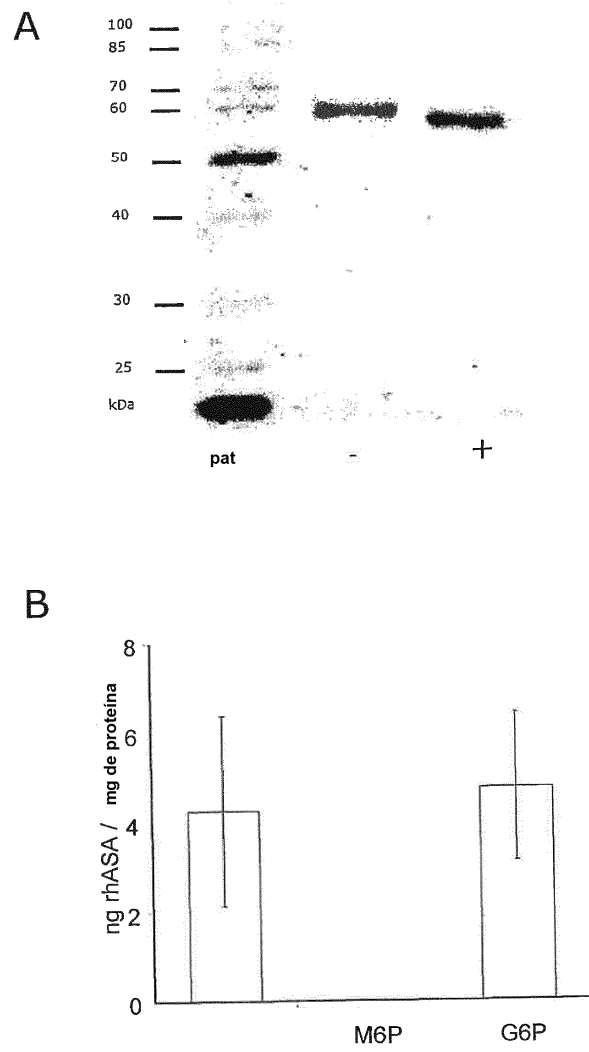


Fig. 7

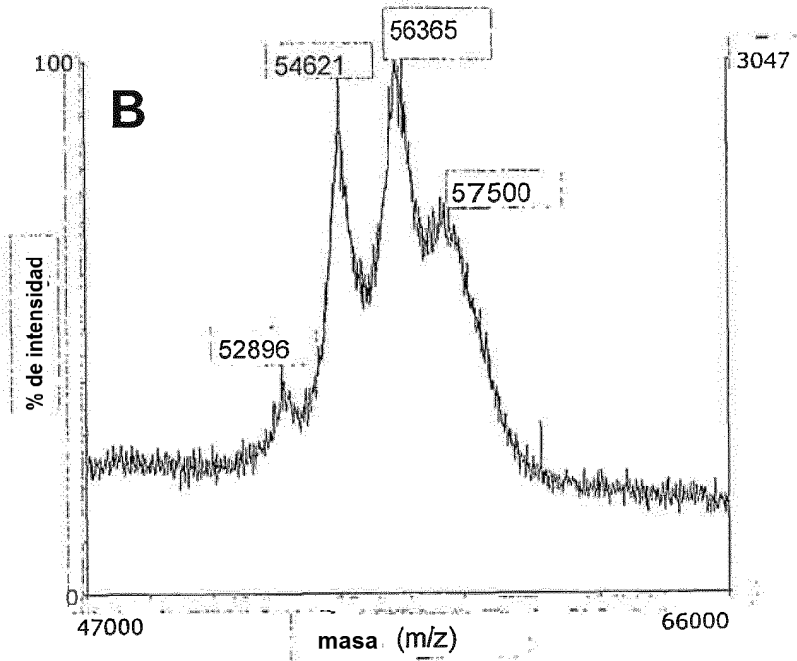
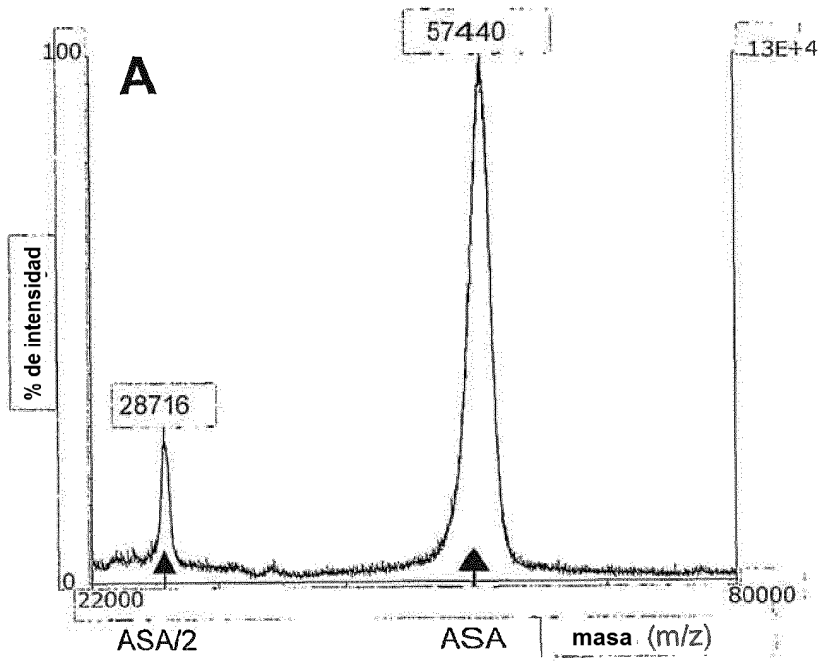


Fig. 8

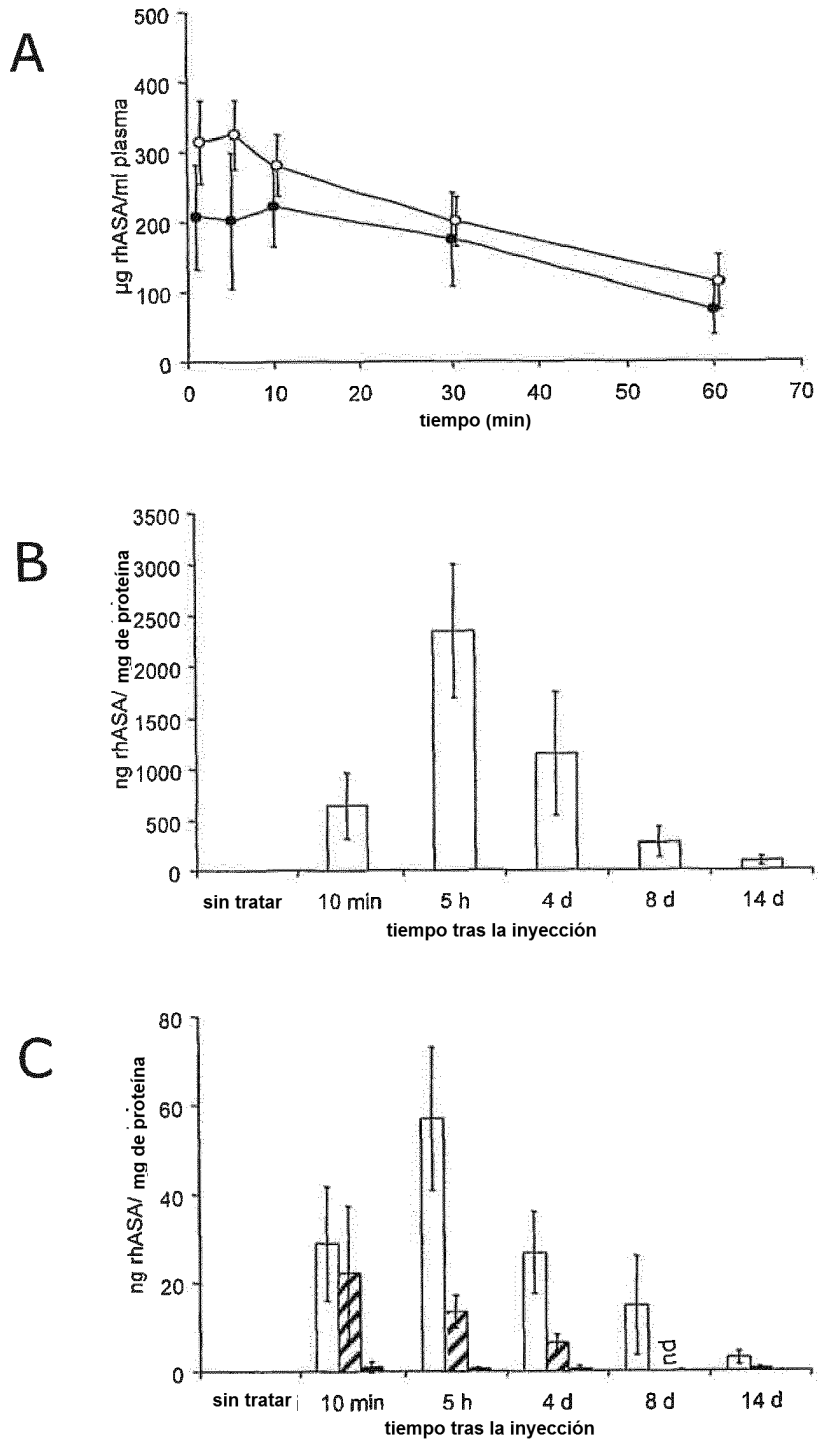
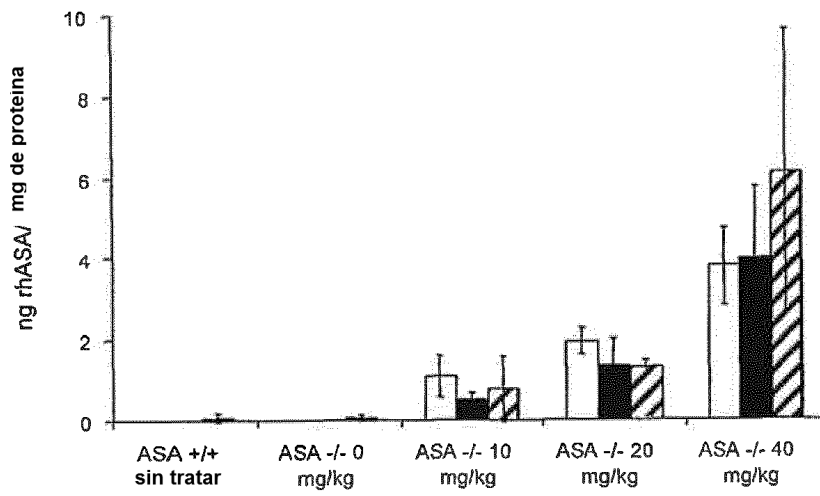


Fig. 9

A



B

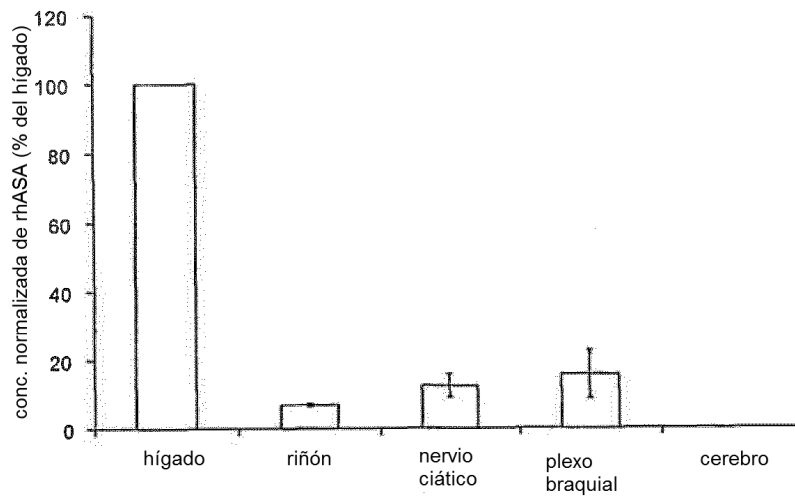


Fig. 10

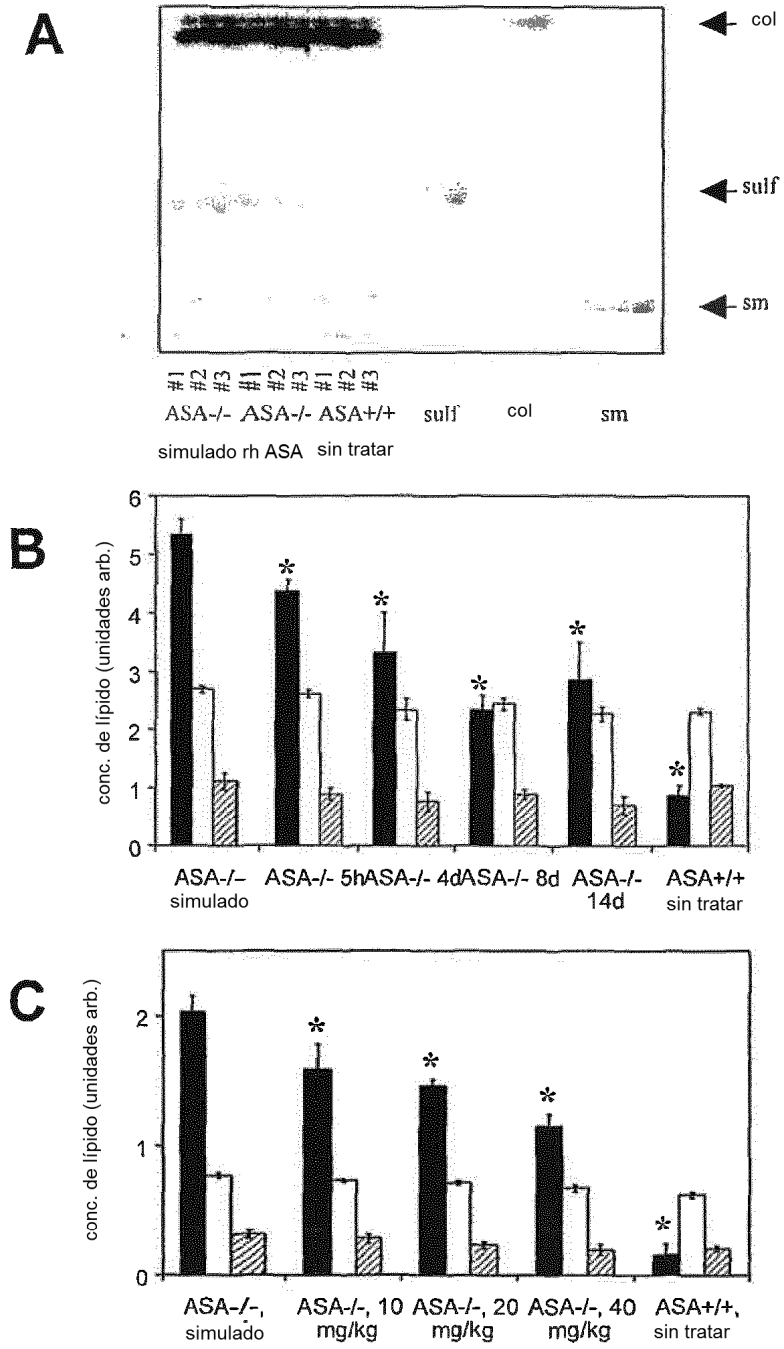


Fig. 11

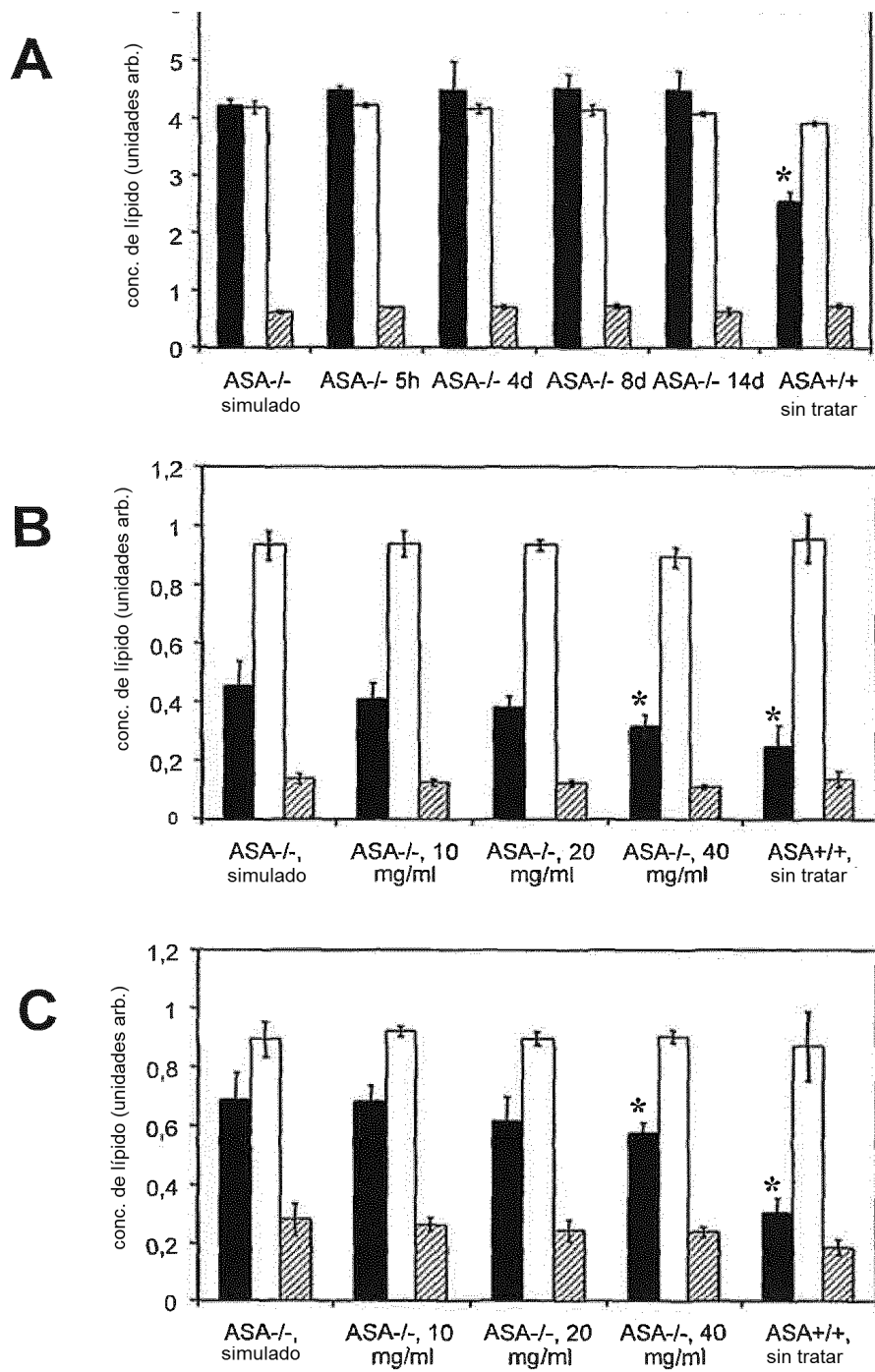


Fig. 12

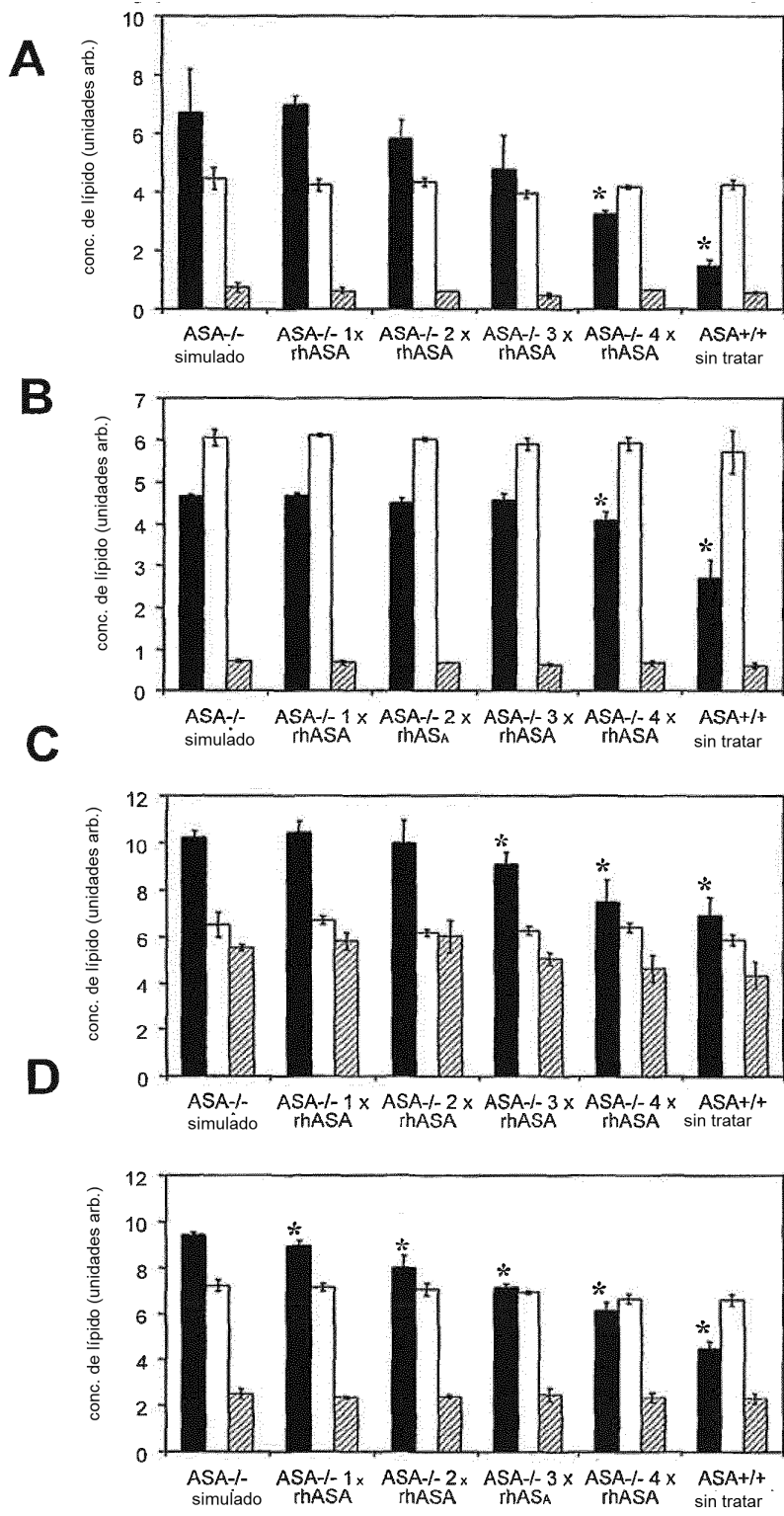


Fig. 13

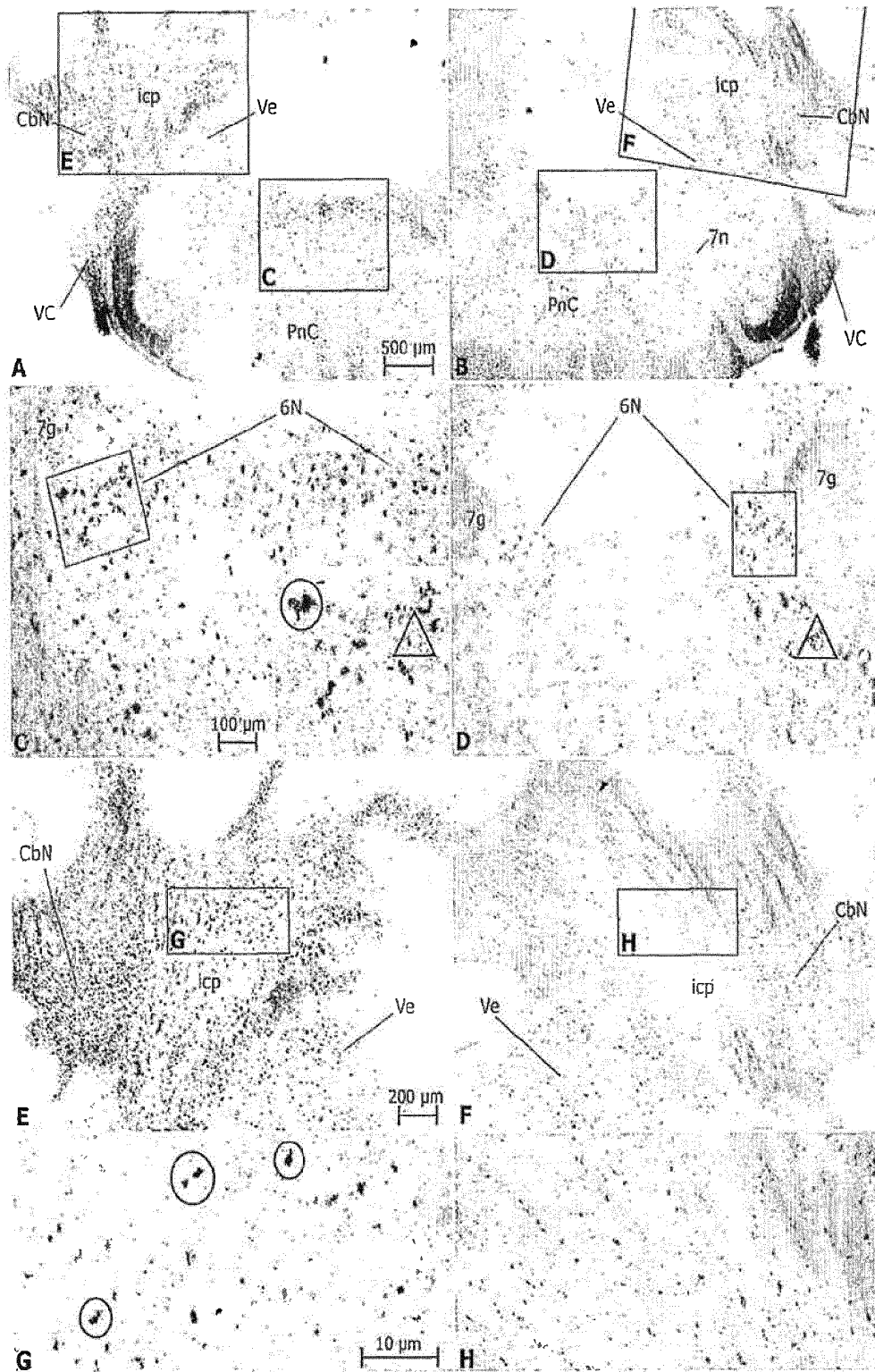


Fig. 14

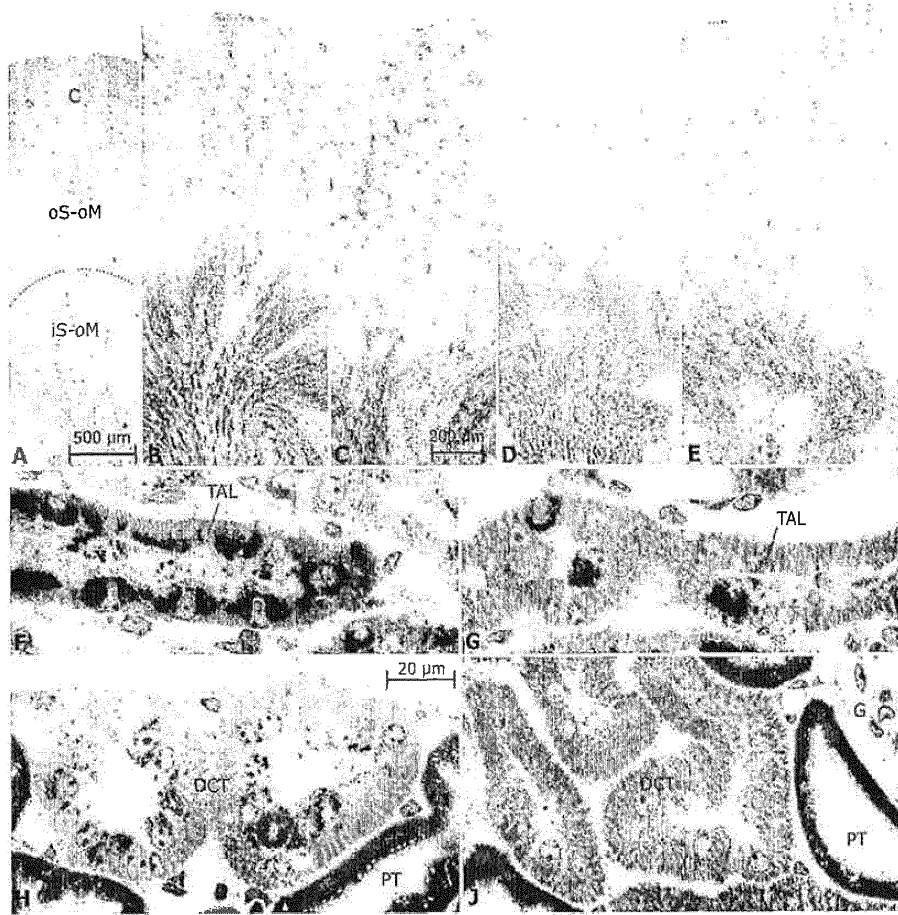


Fig. 15

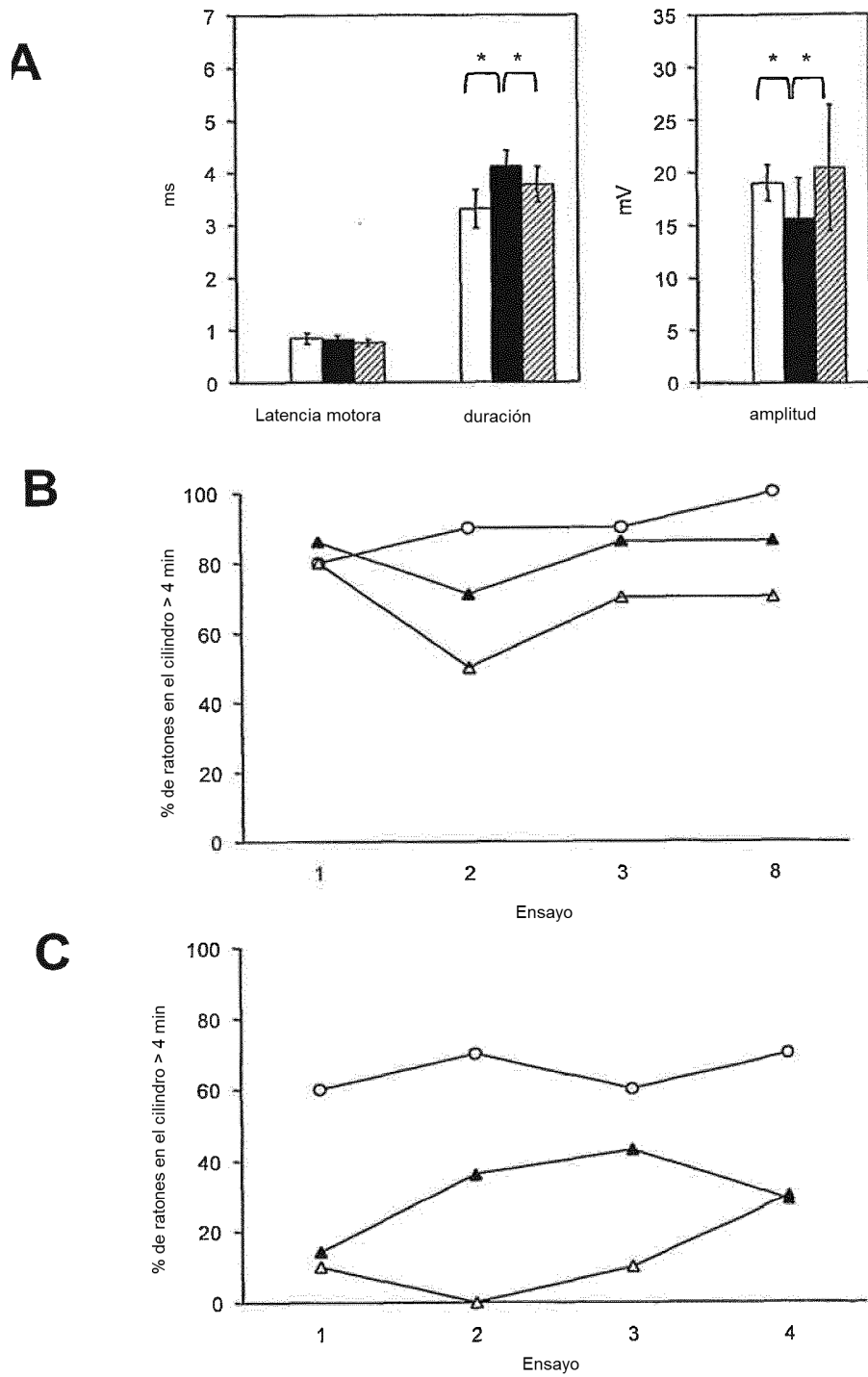


Fig. 16

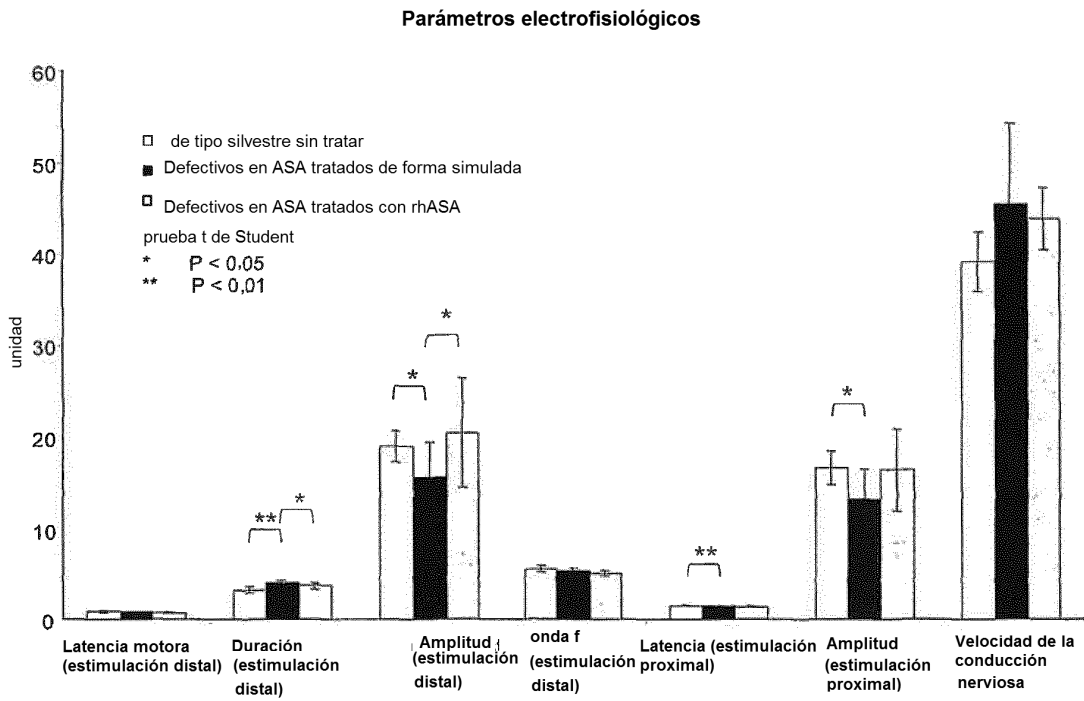


Fig. 17