

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 923**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7012 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2015 PCT/US2015/018859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15134696**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015 E 15758766 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3113781**

54 Título: **Composiciones de glicoproteínas sialiladas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

05.03.2014 US 201461948421 P
10.02.2015 US 201562114313 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2019

73 Titular/es:

ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
60 Leveroni Court
Novato, CA 94949, US

72 Inventor/es:

JUNGLES, STEVEN;
MORRIS, GABRIELLE;
GRUBB, JEFF;
VELLARD, MICHAEL y
KAKKIS, EMIL D.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 704 923 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

Composiciones de glicoproteínas sialiladas y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere a composiciones de glicoproteínas sialiladas y a métodos de uso en el tratamiento de diversas afecciones y trastornos.

Antecedentes de la invención

10 El número de proteínas terapéuticas disponibles comercialmente ha aumentado dramáticamente en los últimos años y la mayoría de estas proteínas son glicoproteínas. La presencia de ácido siálico en una glicoproteína puede afectar positivamente la absorción, la vida media en suero y la eliminación del suero, así como las propiedades físicas, químicas e inmunogénicas de la glicoproteína respectiva. En ciertas circunstancias, por lo tanto, puede ser deseable aumentar el contenido de ácido siálico de una glicoproteína destinada para uso en aplicaciones farmacológicas.

Sumario de la invención

15 La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que la glicoproteína recombinante producida a partir de células de mamíferos mediante el uso de medios libres de suero/proteína mejora la sialilación de la glicoproteína recombinante, por ejemplo, sin reducir el contenido de M6P de la glicoproteína recombinante.

20 Se divulgan ejemplos de una composición que comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,05 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,1 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 1 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 1,5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 2 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 10 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 20 mol/mol de la glicoproteína recombinante.

25 En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante están sialilados.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que la glicoproteína recombinante es β -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante.

40 En algunas otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que la glicoproteína recombinante es β -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un alto nivel de restos de manosa-6-fosfato (M6P).

En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que la glicoproteína recombinante es β -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un alto nivel de restos de manosa-6-fosfato (M6P) de al menos 10% en moles del glicano total de la glicoproteína recombinante.

45 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que la glicoproteína recombinante es β -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un alto nivel de restos de manosa-6-fosfato (M6P), por ejemplo, la captación de K está en su 60%, 70%, 80%, 90% o máximo, tal como de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 3 nM cuando se analiza en células de fibroblastos humanos (MPS7).

50 En otra realización más, la presente invención proporciona una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que la glicoproteína recombinante es β -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y un alto nivel de restos de manosa-6-fosfato (M6P), por ejemplo, una captación media máxima en células de fibroblastos humanos, tal como concentraciones en las que la glicoproteína (por ejemplo, β -glucuronidasa humana) alcanza el 50% de la captación máxima es aproximadamente no

más de 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM o 5 nM.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 50 por ciento de la población está sialilada. En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 60 por ciento de la población está sialilada. En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 70 por ciento de la población está sialilada. En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 80 por ciento de la población está sialilada. En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona una preparación de una población de una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 90 por ciento de la población está sialilada.

También se proporciona un método para preparar una composición/preparación de acuerdo con la presente invención. En algunos ejemplos, el método comprende expresar la glicoproteína recombinante en un cultivo celular con un medio libre de proteínas o suero. En algunos ejemplos, se pueden usar medios químicamente definidos sin proteínas para hacer crecer las células. En algunos ejemplos, los medios no incluyen una cantidad efectiva de un azúcar seleccionado de galactosa, fructosa, n-acetil-manosamina, manosa y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la cantidad efectiva de un azúcar es mayor que 0,01 mM, 0,05 mM o 0,1 mM.

En algunos ejemplos, un cultivo celular comprende una célula de mamífero. Los ejemplos de células de mamífero incluyen pero no se limitan a células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, mieloma (por ejemplo, NSO, NSI) o células WI38. En un ejemplo específico, las células de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO).

En algunos otros ejemplos, un cultivo celular comprende una célula vegetal. Los ejemplos de células vegetales incluyen, pero no se limitan a células de zanahoria o cualquier otro cultivo celular basado en células vegetales, por ejemplo, desarrollado para la producción de proteínas recombinantes.

Además, se proporciona una composición de la invención para su uso en un método para tratar el trastorno de almacenamiento lisosomal (LSD) que comprende administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/preparación como se describe en el presente documento. La composición/preparación comprende β -glucuronidasa humana recombinante. En un ejemplo de realización, el LSD es mucopolisacaridosis tipo 7 (es decir, MPS 7, MPS VII o síndrome de Sly). En algunas realizaciones, las β -glucuronidasas humanas recombinantes proporcionadas en el presente documento tienen un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante y son particularmente útiles para tratar un LSD, por ejemplo, MPS 7.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de la invención para uso en un método para tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal (LSD) en un sujeto, que comprende administrar un régimen de la composición/preparación como se describe en el presente documento, en la que la administración Proporciona un efecto terapéutico estadísticamente significativo para el tratamiento de la LSD. La composición/preparación comprende β -glucuronidasa humana recombinante. En un ejemplo de realización, el LSD es MPS 7.

Las realizaciones preferidas de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describe a continuación o como se define en las sub-reivindicaciones.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "efectivo" (por ejemplo, "una cantidad efectiva") significa adecuado para lograr un resultado deseado, esperado o previsto. Una cantidad efectiva puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un ingrediente activo que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de una enfermedad o afección particular. La "cantidad terapéuticamente efectiva" variará dependiendo, por ejemplo, de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, y la edad, el peso, etc., del sujeto a tratar.

En general, "tratar" o "tratamiento" de cualquier afección, enfermedad o trastorno se refiere, en algunas realizaciones, a mejorar la afección, enfermedad o trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas clínicos). En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el sujeto. En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la inhibición de la afección, enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico) o ambos. En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar la aparición de una afección, enfermedad o trastorno.

Según la antigua convención de la ley de patentes, los términos "un", "uno, una" y "el, la" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones. El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes. Se contempla específicamente que cualquier lista de ítems que use el término "o" significa que cualquiera de esos artículos enumerados también puede ser excluido específicamente de la realización

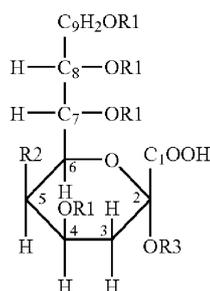
relacionada.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

5 Una glicoproteína, como se usa en el presente documento, es una proteína que se ha modificado mediante la adición de uno o más carbohidratos, incluyendo, especialmente, la adición de uno o más residuos de azúcar.

Como se usa en este documento, "GUS" se refiere a β -glucuronidasa, una glicoproteína de acuerdo con la presente invención.

10 La sialilación, como se usa en este documento, es la adición de un residuo de ácido siálico a una proteína, que puede ser una glicoproteína. El término ácido siálico, como se usa en este documento, abarca una familia de azúcares que contienen 9 o más átomos de carbono, incluyendo un grupo carboxilo. A continuación se muestra una estructura genérica que abarca todas las formas naturales conocidas de ácido siálico.



15 Los grupos R1 en varias posiciones en una sola molécula pueden ser iguales o diferentes entre sí. R1 puede ser un hidrógeno o un grupo acetilo, lactilo, metilo, sulfato, fosfato, anhidro, ácido siálico, fucosa, glucosa o galactosa. R2 puede ser un grupo N-acetilo, N-glicolilo, amino, hidroxilo, N-glicolil-O-acetilo o N-glicolil-O-metilo. R3 representa el residuo de azúcar precedente en un oligosacárido al que se une el ácido siálico en el contexto de una glicoproteína. R3 puede ser galactosa (conectada en su posición 3, 4 o 5), N-acetil-galactosa (conectada en su posición 6), N-acetil-glucosa (conectada en su posición 4 o 6), ácido siálico (conectado en su posición 8 o 9), o ácido 5-N-glicolil-neuramínico. Essentials of Glycobiology, Ch. 15, Varki et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1999). Más de 40 formas de ácido siálico se han encontrado en la naturaleza. Essentials of Glycobiology, capítulo 15, Varki et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1999). Una forma común de ácido siálico es el ácido N-acetilneuramínico (NANA), en el que R1 es un hidrógeno en todas las posiciones y R2 es un grupo N-acetilo.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es un gráfico que compara la farmacocinética de las β -glucuronidasas humanas recombinantes, GUS CR01 frente a GUS Lote 43/44 en ratas mediante una infusión de dos etapas. Los datos muestran que la infusión con el CR01 sialilado más alto da como resultado una eliminación menos rápida y una concentración media más alta durante la infusión, lo que aumenta la exposición total a la enzima, mejorando potencialmente su penetración en los tejidos que son más difíciles de tratar.

30 La Figura 2 es un gráfico que muestra solo la fase de eliminación posterior a la infusión de GUS CR01 frente a GUS Lote 43/44 que se usó para calcular los valores de $t_{1/2}$. Estas diferencias en la tasa de eliminación son suficientes para dar como resultado niveles más altos en suero de enzimas, como se muestra en la Figura 1.

35 La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran los niveles de GUS en tejidos para el estudio farmacocinético de GUS CR01 frente a GUS Lote 43/44. Se ha demostrado que el suministro y captación por el tejido de β -glucuronidasas humanas mejora, a medida que la captación total de β -glucuronidasas humanas sialiladas (CR01) es mayor en todos los tejidos que la enzima sialilada inferior (43-44). Cuando la actividad de glucuronidasa endógena se resta, la administración efectiva de las β -glucuronidasas humanas terapéuticas aumenta de 2 veces a casi 10 veces, un hallazgo excepcional y sorprendente.

40 La Figura 4 es un gráfico que muestra la medición de los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) durante 36 semanas en tres sujetos tratados con β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS). Se observó una reducción rápida y sostenida dependiente de la dosis en los niveles de uGAG en sujetos tratados con rhGUS.

La Figura 5 ilustra la reducción media en los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) al final de cada intervalo de dosificación durante una evaluación de 36 semanas de tres sujetos tratados con rhGUS. Una dosis de 4 mg/kg de QOW resultó en la mayor reducción de los niveles de uGAG.

45 La Figura 6 es un gráfico que muestra la medición de los niveles de glicosaminoglicano (GAG) en suero durante 36 semanas en tres sujetos tratados con rhGUS. Cada sujeto demostró al menos una reducción del 25% en los niveles en suero de GAG al final del programa de tratamiento de 36 semanas.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la medición del tamaño del hígado en sujetos tratados con rhGUS. Se observó una reducción significativa en la hepatomegalia resultante del protocolo de tratamiento de 36 semanas.

Descripción detallada de la invención

5 La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que la glicoproteína recombinante producida a partir de células de mamíferos a través del uso de medios libres de suero/proteína mejora la sialilación de la glicoproteína recombinante, y adicionalmente los niveles de restos de manosa-6-fosfato de la glicoproteína recombinante.

Composiciones de glicoproteínas sialiladas

10 Las composiciones tal como se describen en el presente documento comprenden una o más glicoproteínas que tienen un alto nivel o un contenido elevado de ácido siálico.

15 Los ácidos siálicos representan una familia de amino azúcares con 9 carbonos con más de 50 miembros derivados del ácido N-acetiluramínico. El ácido siálico es solo un componente de varios monosacáridos que forman glicanos de glicoproteínas, pero tiene un impacto sobresaliente en la calidad y estabilidad de cualquier glicoproteína terapéutica por varias razones: (I) los residuos de galactosa terminales son uno de los factores principales que determinan la semivida en suero de glicoproteínas. La semivida en suero está regulada por la expresión de los receptores de asialo-glicoproteína en el hígado. Estos receptores se unen a las glicoproteínas no sialiladas y las asialo-glicoproteínas unidas se eliminan del suero mediante endocitosis. Como consecuencia, la expresión del ácido siálico terminal en los residuos de galactosa evita la degradación de las glicoproteínas en suero; (II) los ácidos siálicos son importantes para enmascarar determinantes antigénicos o epítopos. Se sabe que los receptores del sistema inmunitario (receptores de células T y B) a menudo prefieren estructuras no sialiladas. Por lo tanto, la posibilidad de generación de anticuerpos contra las glicoproteínas terapéuticas se correlaciona con el grado de su sialilación; (III) los ácidos siálicos con carga negativa influyen en los parámetros específicos de la proteína, tales como la estabilidad térmica, resistencia a la degradación proteolítica o su solubilidad (Bork et al., Increasing the Sialylation of Therapeutic Glycoproteins: The potential of the Sialic Acid Biosynthetic Pathway, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 98, No. 10, octubre de 2009).

25 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,05 mol/mol, 0,1 mol/mol, 0,5 mol/mol, 0,7 mol/mol, 1 mol/mol, 1,5 mol/mol, 2 mol/mol, 5 mol/mol, 10 mol/mol o 20 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico superior a 0,5 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En ejemplos adicionales, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico superior a 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En ciertos ejemplos adicionales, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un contenido de ácido siálico mayor que 1 mol/mol de la glicoproteína recombinante.

35 En las realizaciones de la invención, la glicoproteína recombinante es una forma recombinante de β -glucuronidasa humana, una enzima responsable de catalizar la hidrólisis de residuos de ácido β -D-glucurónico del extremo no reductor de mucopolisacáridos. En algunas realizaciones, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico superior a 0,7 mol/mol, 1 mol/mol, 1,5 mol/mol, 2 mol/mol o 5 mol/mol de la rhGUS. También se proporcionan ejemplos en los que la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico superior a 0,1 mol/mol, 0,5 mol/mol de la rhGUS. En un ejemplo de realización, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico superior a 0,7 mol/mol de la rhGUS. En otro ejemplo de realización, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico superior a 1,0 mol/mol de la rhGUS. En otro ejemplo de realización, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,2 mol/mol de la rhGUS.

45 También se proporcionan ejemplos en los que la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,5 mol/mol hasta aproximadamente 2,0 mol/mol de la rhGUS. También se proporcionan ejemplos en los que la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,6 mol/mol hasta aproximadamente 1,5 mol/mol de la rhGUS. En una realización, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,7 mol/mol hasta aproximadamente 1,4 mol/mol de la rhGUS. En un ejemplo de realización, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,8 mol/mol hasta aproximadamente 1,3 mol/mol de la rhGUS. En otro ejemplo de realización, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,0 mol/mol hasta aproximadamente 1,2 mol/mol de la rhGUS.

55 En algunos ejemplos, la composición de la presente invención incluye una glicoproteína recombinante que tiene al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de sitios adecuados para enlace de ácido siálico sialilado. En general, la galactosa es el sitio adecuado para el enlace del ácido siálico o sialilación. En ciertos ejemplos, una composición comprende una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante son sialilados. En algunos ejemplos,

la composición comprende una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 50% de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante están sialilados. En ejemplos adicionales, la composición comprende una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 60% de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante están sialilados. En ciertos ejemplos adicionales, la composición comprende una glicoproteína recombinante, en la que al menos el 70% de los residuos de galactosa de la glicoproteína recombinante están sialilados.

En las realizaciones, la glicoproteína recombinante es una β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS). En algunas realizaciones, al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, u 80% de los residuos de galactosa de la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) están sialilados. En un ejemplo de realización, al menos el 50% de los residuos de galactosa de la rhGUS están sialilados. En otro ejemplo de realización, al menos el 60% de los residuos de galactosa de la rhGUS están sialilados. En otro ejemplo de realización, al menos el 70% de los residuos de galactosa de la rhGUS están sialilados. En aún otro ejemplo de realización, aproximadamente el 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, o aproximadamente el 75% de los residuos de galactosa de la rhGUS están sialilados.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 40% hasta al menos aproximadamente el 90% de los residuos de galactosa de la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) están sialilados. En una realización, al menos aproximadamente el 50% hasta al menos aproximadamente el 80% de los residuos de galactosa de la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) están sialilados. En otra realización, al menos aproximadamente 60% hasta al menos aproximadamente 80% de los restos de galactosa de la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) están sialilados. En un ejemplo de realización, al menos aproximadamente el 65% hasta al menos aproximadamente el 75% de los residuos de galactosa de la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) están sialilados.

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una glicoproteína recombinante que tiene un alto nivel de contenido de ácido siálico, así como un alto nivel de restos de manosa-6-fosfato (M6P). Como se usa en el presente documento, los restos de M6P incluyen cualquier manosa-6-fosfato capaz de unirse o ser reconocida por los receptores de M6P, incluyendo sin ninguna limitación la manosa-6-fosfato mono-fosforilada y bis-fosforilada. En un ejemplo, los restos de M6P incluyen cualquier unión de M6P a un receptor de M6P independiente del catión (CI-MPR). En otro ejemplo, los restos de M6P incluyen cualquier unión de M6P a receptor de M6P dependiente de catión (CD-MRP). En otro ejemplo más, los restos de M6P incluyen cualquier M6P bis-fosforilado.

De acuerdo a la presente invención, un alto nivel de restos de manosa-6-fosfato puede incluir cualquier nivel de restos de M6P que un experto en la técnica considere alto, por ejemplo, medido utilizando cualquier medio adecuado conocido o desarrollado más adelante por un experto en la materia. En un ejemplo, un alto nivel de restos de M6P de una glicoproteína recombinante incluye niveles de restos de M6P de al menos 10% en moles, 11% en moles, 12% en moles, 13% en moles, 14% en moles o 15% en moles del glicano total de la glicoproteína recombinante. Por ejemplo, la glicoproteína recombinante puede tener un alto nivel de M6P de acuerdo a lo determinado por el porcentaje del área del pico de M6P sobre el área del pico de glicano total, por ejemplo, al menos el 10%, 11%, 12%, 13%, 14% o 15%. En algunas realizaciones, la glicoproteína recombinante es una β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) y comprende niveles de restos de M6P de al menos 10% en moles, 11% en moles, 12% en moles, 13% en moles, 14% en moles o 15% en moles del glicano total de la rhGUS. En un ejemplo de realización, la rhGUS comprende niveles de restos de M6P de aproximadamente 13% a aproximadamente 15%.

En otro ejemplo, un alto nivel de restos de M6P de una glicoproteína recombinante incluye un alto nivel de captación de la glicoproteína recombinante por células humanas, por ejemplo, una alta cantidad de captación de afinidad por células de fibroblastos humanos. Por ejemplo, la glicoproteína recombinante puede tener una absorción de K dependiente de M6P de no más de 1 nM, 1,1 nM, 1,2 nM, 1,3 nM, 1,4 nM, 1,5 nM, 1,6 nM, 1,7 nM, 1,8 nM, 1,9 nM, 2 nM, 2,1 nM, 2,2 nM, 2,3 nM, 2,4 nM, 2,5 nM, 2,6 nM, 2,7 nM, 2,8 nM, 2,9 nM, 3 nM, 4 nM, o 5 nM por cualquier célula humana adecuada, por ejemplo, células de fibroblastos humanos. En algunas realizaciones, la glicoproteína recombinante es una β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) y tiene una captación de K dependiente de M6P de menos de 5 nM, menos de 4 nM, menos de 3 nM o menos de 2 nM. En un ejemplo de realización, la rhGUS tiene una absorción de K dependiente de M6P de aproximadamente 1,2 nM a aproximadamente 1,8 nM.

En otro ejemplo más, un alto nivel de restos de M6P en una glicoproteína recombinante incluye concentraciones más bajas requeridas para lograr la captación máxima de la glicoproteína recombinante por células humanas, por ejemplo, una concentración media máxima. Por ejemplo, la glicoproteína recombinante puede lograr una captación máxima por parte de las células humanas, por ejemplo, células de fibroblastos en concentraciones inferiores a 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM. En algunas realizaciones, la glicoproteína recombinante es una β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) que puede lograr una captación máxima por parte de células humanas, por ejemplo, células de fibroblastos en concentraciones de menos de 5 nM, menos de 4 nM, menos de 3 nM o menos 2 nM. En un ejemplo de realización, la rhGUS puede lograr la máxima captación por células humanas, por ejemplo, células de fibroblastos en concentraciones de aproximadamente 1,2 nM a aproximadamente 1,8 nM.

En otro ejemplo, un alto nivel de restos de M6P en una glicoproteína recombinante incluye uno o más niveles de restos de M6P correspondientes a niveles de restos de M6P asociados con el contenido de sialilación natural de la glicoproteína recombinante, por ejemplo, contenido de sialilación de la glicoproteína recombinante antes de cualquier medio de mejoramiento, tal como el uso de los métodos divulgados en la presente solicitud.

De acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, la glicoproteína recombinante, es decir, una β -glucuronidasa humana recombinante, tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un alto nivel de restos de M6P de al menos 10% en moles, 11% en moles, 12% en moles, 13% en moles, 14% en moles o 15% en moles del glicano total de la glicoproteína recombinante. En una realización, la glicoproteína recombinante, es decir, una β -glucuronidasa humana recombinante, tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un alto nivel de restos de M6P con una captación de al menos 1 nM, 1,1 nM, 1,2 nM, 1,3 nM, 1,4 nM, 1,5 nM, 1,6 nM, 1,7 nM, 1,8 nM, 1,9 nM o 2 nM por células humanas, por ejemplo, células de fibroblastos humanos. En otra realización, la glicoproteína recombinante, es decir, una β -glucuronidasa humana recombinante tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un alto nivel de restos de M6P con captación máxima por células humanas, por ejemplo, células de fibroblastos humanos a menos de 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, o 1 nM de la glicoproteína recombinante.

También se proporciona una composición que comprende una población de glicoproteínas recombinantes, en la que al menos el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la población está sialilada. En un ejemplo, al menos el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la población es glicoproteína recombinante de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, con respecto al contenido de sialilación y el nivel de M6P.

La glicoproteína recombinante de la presente divulgación puede ser cualquier glicoproteína. Los ejemplos de glicoproteínas recombinantes incluyen aquellas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares a la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas: un ligando Flt3 (como se describe en el documento WO 94/28391), un ligando CD40 (como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.087.329), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, leptina, IL-2, angiopoyetina-2 (según lo descrito por Maisonpierre et al. (1997), Science 277 (5322): 55-60), ligando Fas, ligando para el activador del receptor de NF-kappa B (RANKL, como se describe en el documento WO 01/36637), ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, como se describe en el documento WO 97/01633), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, como se describe en la patente australiana NO. 588.819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (descrito, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento y desarrollo de megacariotas, RANTES, hormona del crecimiento, insulina, insulintropina, factores de crecimiento similares a la insulina, hormona paratiroidea, interferones que incluyen interferones α , interferones γ e interferones de consenso (como los descritos en la patente de Estados Unidos Pat. Nos. 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleuquinas 1 a 18, factores estimulantes de colonias, linfotóxina- β , factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de la leucemia, oncostatina-M y varios ligandos para las moléculas de la superficie celular ELK y Hek (tal como los ligandos para las quinasas relacionadas con eph o LERKS). Las descripciones de proteínas que pueden producirse de acuerdo con los métodos descritos se pueden encontrar, por ejemplo, en Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, vol. II (Aggarwal y Gutterman, editores. Blackwell Sciences, Cambridge, Mass., 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay y Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); y The Cytokine Handbook (A. W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1991).

Las glicoproteínas recombinantes de la presente divulgación pueden incluir cualquier enzima lisosomal, especialmente cualquier enzima útil para la terapia de reemplazo enzimático (ERT). Los ejemplos de tales enzimas incluyen, sin limitación, ácido alfa-glucosidasa, ácido beta-glucosidasa o glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, ácido beta-galactosidasa, beta-hexosaminidasa A, beta-hexosaminidasa B, esfingomielinasa ácida, galactocerebrosidasa, ceramidasa ácida, arilsulfatasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparano N-sulfatasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, acetyl-CoA, alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, ácido beta-galactosidasa, arilsulfatasa B, ácido alfa-manosidasa, ácido beta-manosidasa, ácido alfa-L-fucosidasa, sialidasa y alfa-N-acetilgalactosaminidasa.

La glicoproteína recombinante de la presente invención es β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS). La β -glucuronidasa humana es una glicoproteína que contiene hasta 16 oligosacáridos por molécula, incluida una variedad de cadenas que son de tipo alto en manosa, complejos e híbridos.

En el presente documento también se describen polipéptidos de glicoproteína aislados o purificados. Por ejemplo, en el presente documento se divulgan polipéptidos de rhGUS aislados o purificados. Los polipéptidos rhGUS aislados o purificados divulgados pueden usarse en una o más de las composiciones o métodos divulgados en el presente documento.

Los polipéptidos de rhGUS pueden incluir la secuencia peptídica de rhGUS así como también fragmentos de la misma, variantes naturales de la misma y variantes no naturales de la misma. La secuencia de rhGUS se proporciona en la SEQ ID NO: 1. Se divulgan en el presente documento polipéptidos aislados o purificados que consisten en la SEQ ID NO: 1. También se divulgan en el presente documento polipéptidos aislados o purificados que comprenden la SEQ ID NO: 1, así como también sus fragmentos. Los fragmentos pueden ser de al menos aproximadamente 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 o 500, o más aminoácidos contiguos. En el presente documento también se divulgan polinucleótidos aislados o purificados que consisten en o comprenden una secuencia de polinucleótidos capaz de codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En algunos ejemplos, el polipéptido rhGUS tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,1 mol/mol, o 0,5 mol/mol. En algunas realizaciones, el polipéptido rhGUS tiene un contenido de ácido siálico mayor que 0,7 mol/mol, 1 mol/mol, 1,5 mol/mol, 2 mol/mol, o 5 mol/mol del polipéptido rhGUS. También se proporcionan ejemplos en los que el polipéptido rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,5 mol/mol a aproximadamente 2,0 mol/mol del polipéptido rhGUS. También se proporcionan ejemplos en los que el polipéptido rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,6 mol/mol a aproximadamente 1,5 mol/mol del polipéptido rhGUS. En una realización, el polipéptido rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,7 mol/mol a aproximadamente 1,4 mol/mol del polipéptido rhGUS. En un ejemplo de realización, el polipéptido rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 0,8 mol/mol a aproximadamente 1,3 mol/mol del polipéptido rhGUS. En otro ejemplo de realización, el rhGUS tiene un contenido de ácido siálico de aproximadamente 1,0 mol/mol a aproximadamente 1,2 mol/mol del polipéptido rhGUS.

En realizaciones adicionales, al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, u 80% de los residuos de galactosa del polipéptido rhGUS están sialilados. En un ejemplo de realización, al menos aproximadamente el 65% a al menos aproximadamente el 75% de los residuos de galactosa del polipéptido rhGUS están sialilados.

Como se describe en el presente documento, las glicoproteínas de la invención se producen de forma recombinante. Un polinucleótido que codifica una glicoproteína recombinante de la invención puede introducirse en un vector de expresión recombinante. La glicoproteína recombinante es rhGUS. Por consiguiente, la solicitud también se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica rhGUS. En una realización, la proteína rhGUS producida por el vector de expresión recombinante consiste en o comprende la SEQ ID NO: 1.

Como se entiende en la técnica, los vectores recombinantes pueden expresarse en un sistema de células huésped adecuado usando técnicas bien conocidas en el arte. Por consiguiente, la solicitud también se refiere a una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica rhGUS. En una realización, la proteína rhGUS producida por la célula huésped consiste en o comprende la SEQ ID NO: 1. Las células huésped adecuadas para expresar la proteína rhGUS de la presente invención pueden incluir cualquier línea celular que pueda glicosilar proteínas, preferiblemente una línea celular de mamífero que ha sido modificada genéticamente para expresar una proteína. Por ejemplo, pueden usarse células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, mieloma (por ejemplo, NSO, NSI) o WI38. En un ejemplo de realización, las células utilizadas para producir la glicoproteína recombinante son células de ovario de hámster chino (CHO).

También se proporciona una formulación que comprende una o más glicoproteínas que tienen un alto nivel o un contenido elevado de ácido siálico. Las formulaciones en general incluyen formas líquidas (soluciones) tales como, pero no limitadas a liofilizados reconstituidos, y formas sólidas tales como, pero no limitadas a formas liofilizadas, geles, partículas microencapsuladas y pastas. Las formulaciones pueden ser combinaciones de formulaciones líquidas, liofilizados y soluciones líquidas preparadas a partir de liofilizados reconstituidos utilizados en combinación con gel, partículas o pastas.

En algunos ejemplos, la formulación es una solución que incluye un regulador acuoso y la glicoproteína recombinante. El regulador puede incluir fosfato de sodio (Na-Pi), histidina, arginina, glicilglicina, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido aspártico, ácido succínico o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, el regulador incluye Na-Pi e histidina. En otro ejemplo, el regulador incluye na-Pi, histidina y arginina.

En algunos ejemplos, el regulador incluye además uno o más ingredientes adicionales tales como, pero sin limitación, cloruro de sodio (NaCl), polietileno (Tween-20), cloruro de potasio y sorbitol (por ejemplo, D-sorbitol). En un ejemplo, el regulador incluye Na-Pi, histidina, NaCl y Tween 20.

Como es bien apreciado en la técnica, la estabilidad de las proteínas puede depender del pH y/o la fuerza iónica de una formulación. De acuerdo con algunos ejemplos, el pH de la formulación es de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 5,0, por ejemplo, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 6,0. En algunos ejemplos, el pH es aproximadamente 9,0, aproximadamente 8,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 5,5 o aproximadamente 5,0. Fue la presente divulgación la que primero reconoció que un pH más bajo de una formulación mejoraría la estabilidad de la glicoproteína recombinante. Por ejemplo, la Tabla 6 en el Ejemplo 2 demuestra la estabilidad mejorada medida por el porcentaje de tetrámeros cuando el pH se cambió a 6,0 desde 7,5.

Métodos de producción

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la sialilación de una glicoproteína y adicionalmente el nivel de M6P de una glicoproteína producida por un cultivo celular con un medio sin suero o proteína.

En general, los medios de cultivo pueden dividirse en varios subconjuntos en función del nivel de medios definidos. Por ejemplo, un medio de cultivo puede ser: 1) medio que contiene suero (comúnmente 10-20% de suero fetal bovino (FBS)); 2) medios reducidos en suero (comúnmente 1-5% de FBS); 3) medios sin suero (sinónimo de medios definidos); 4) medios sin proteínas (sin proteínas pero que contienen péptidos no definidos de hidrolizados de plantas); 5) medios definidos químicamente (con solo proteínas y/u hormonas recombinantes); 6) medios químicamente definidos, libres

de proteínas (contienen solo constituyentes de bajo peso molecular, pero pueden contener péptidos/hormonas sintéticas); y 7) medios químicamente definidos sin péptidos, sin proteínas (contiene solo constituyentes de bajo peso molecular).

5 En algunos ejemplos, se puede usar un medio reducido en suero para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunos ejemplos, se puede usar un medio sin suero para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunos ejemplos, se puede usar un medio sin proteínas para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunos ejemplos, se puede usar un medio definido químicamente para cultivar células para la expresión de glicoproteínas. En algunos ejemplos, se puede usar un medio químicamente definido sin proteínas para cultivar las células como se demuestra en el Ejemplo 1. Además, en algunos otros ejemplos, se usa un medio
10 químicamente definido sin péptidos y sin proteínas para cultivar células para la expresión de glicoproteínas.

15 Como se entiende bien en la técnica, los medios libres de suero pueden contener productos no definidos derivados de animales tales como albúmina de suero (purificada de la sangre), hidrolizados, factores de crecimiento, hormonas, proteínas transportadoras y factores de unión. Estos productos no definidos derivados de animales contendrán contaminantes complejos, como el contenido de lípidos de la albúmina. En contraste, los medios definidos químicamente se definen como todos los componentes que se identifican y que tienen sus concentraciones exactas conocidas. En algunos ejemplos, un medio definido químicamente está completamente libre de componentes derivados de animales. En algunos ejemplos, un medio definido químicamente excluye FBS, albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano (HAS) o combinaciones de los mismos. Para lograr esto, los medios químicamente definidos se complementan comúnmente con versiones recombinantes de albúmina y factores de crecimiento,
20 generalmente derivados de arroz o *E. coli*, o químicos sintéticos como el polímero polivinil alcohol que puede reproducir algunas de las funciones de BSA/HSA.

25 En algunos ejemplos, el medio sin proteínas descrito en este documento no contiene ninguna proteína o componente de origen biológico. La ausencia de proteínas en el medio elimina el riesgo de contaminación con sangre u otros patógenos o proteínas no humanas. Además, tales medios libres de proteínas generalmente se definen completamente en cuanto a la identidad y cantidad de todos sus ingredientes, lo que puede proporcionar una consistencia del producto sin igual, un perfil de control de calidad del producto superior y una mejor estabilidad del producto que los medios que contienen proteínas.

30 En algunos ejemplos, el medio utilizado en el presente documento no incluye una cantidad eficaz de un azúcar seleccionado de galactosa, fructosa, n-acetilmanosaamina, manosa y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la cantidad efectiva de un azúcar es mayor que 0,01 mM, 0,05 mM o 0,1 mM.

35 En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona un método para cultivar células de mamífero que comprende cultivar en cultivo una célula de mamífero para producir una proteína, por ejemplo, una glicoproteína, en un medio libre de proteínas o suero. Las células adecuadas incluyen cualquier línea celular que pueda glicosilar proteínas, preferiblemente una línea celular de mamífero que haya sido modificada genéticamente para expresar una proteína. En algunos ejemplos, las células son líneas celulares homogéneas. Se conocen numerosas líneas celulares adecuadas en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, mieloma (por ejemplo, NSO, NSI) o WI38. En un ejemplo, las células utilizadas para producir la glicoproteína recombinante son células de ovario de hámster chino (CHO).

40 De acuerdo con algunos ejemplos, las células particularmente útiles son células CHO, que se usan ampliamente para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, citoquinas, factores de coagulación y anticuerpos (Brasel et al. (1996), Blood 88: 2004-2012; Kaufman et al., (1988), J. Biol Chem 263: 6352-6362; McKinnon et al. (1991), J Mol Endocrinol 6: 231-239; Wood y otros (1990), J. Immunol 145: 3011-3016). Una línea celular mutante deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub et al., (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220), tal como DXB11 o DG-44, es útil porque el sistema de expresión génico seleccionable y amplificable, eficiente de DHFL permite la
45 expresión de proteínas recombinantes de alto nivel en estas células (Kaufman (1990), Meth. Enzymol. 185: 527-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o en suspensión y exhiben una estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y las proteínas recombinantes expresadas en ellas han sido ampliamente caracterizadas y aprobadas para su uso en la fabricación clínica comercial por agencias reguladoras.

50 En algunos ejemplos, las células se cultivan en un modo de alimentación por lotes. Un proceso de alimentación por lotes se define como una técnica operativa en la que se agregan uno o más nutrientes (sustratos) a un medio de cultivo para aumentar el crecimiento y lograr una alta densidad celular en un biorreactor. En general, agregar nutrientes de manera controlada tiene un efecto positivo en la tasa de crecimiento y la producción del cultivo. En algunos ejemplos, se puede lograr una concentración de células mayor que 10^6 células/mL, 10^7 células/mL, 2×10^7 células/mL, 5×10^7 células/mL, o 10^8 células/mL en biorreactores. En algunos ejemplos, los biorreactores utilizados en el modo de alimentación por lotes tienen un volumen de al menos 10 L, 20 L, 50 L, 80 L, 100 L, 250 L, 500 L o 1000 L. Las células se pueden cultivar en suspensión o en cultivos adherentes. En un ejemplo, las células se cultivan en suspensión. Se prefieren las células de mamífero, y en un ejemplo particular, las células de mamífero son células de ovario de hámster chino.

Tratamiento terapéutico

Se divulgan métodos para tratar una afección o trastorno que comprende administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/preparación tal como se describe en el presente documento.

5 Las composiciones/preparaciones como se describen en el presente documento pueden usarse solas o junto con cualquier agente/composición terapéutica para diversos fines, tales como en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En este sentido, las composiciones/preparaciones pueden ser farmacéuticamente aceptables.

10 En algunos ejemplos, la afección o trastorno que requiere tratamiento se asocia con una deficiencia enzimática. Las deficiencias de enzimas en los compartimentos celulares tales como el compartimiento de golgi, el retículo endoplásmico y el lisosoma causan una amplia variedad de enfermedades humanas. Por ejemplo, la lisil hidroxilasa, una enzima que normalmente se encuentra en el lumen del retículo endoplásmico, se requiere para el procesamiento adecuado del colágeno; la ausencia de la enzima causa el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI, un trastorno grave del tejido conectivo. GnT II, que normalmente se encuentra en el compartimiento de golgi, se requiere para la glicosilación normal de proteínas; la ausencia de GnT II conduce a defectos en el desarrollo del cerebro.

15 En un ejemplo, la afección o trastorno asociado con una deficiencia de enzima es un trastorno de almacenamiento lisosomal (LSD). Más de cuarenta enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD) son causadas, directa o indirectamente, por la ausencia de una o más proteínas en el lisosoma. Los LSD surgen del metabolismo anormal de diversos sustratos, incluidos los glicoesfingolípidos, glicógeno, mucopolisacáridos y glicoproteínas. El metabolismo de los sustratos se presenta normalmente en el lisosoma y el proceso se regula en un proceso paso a paso por varias enzimas degradativas. Por lo tanto, una deficiencia en cualquier actividad enzimática puede perturbar todo el proceso y resultar en la acumulación de sustratos particulares. A continuación se enumeran una serie de trastornos de almacenamiento lisosomal y las enzimas defectuosas correspondientes:

Enfermedad de Pompe: Alfa-glucosidasa ácida

Enfermedad de Gaucher: Beta-glucosidasa ácido o glucocerebrosidasa

Enfermedad de Fabry: Alfa-galactosidasa A

25 GMI-gangliosidosis: Beta-galactosidasa ácida

Enfermedad de Tay-Sachs: Beta-hexosaminidasa A

Enfermedad de Sandhoff: Beta-hexosaminidasa B

Enfermedad de Niemann-Pick: Esfingomielinasa ácida

Enfermedad de Krabbe: Galactocerebrosidasa

30 Enfermedad de Farber: Ceramidasa ácida

Leucodistrofia metacromática: Arilsulfatasa A

Enfermedad de Hurler-Scheie: Alfa-L-Iduronidasa

Enfermedad del cazador: Iduronato-2-sulfatasa

Enfermedad de Sanfilippo A: Heparano N-sulfatasa

35 Enfermedad de Sanfilippo B: Alfa-N-acetilglucosaminidasa

Enfermedad de Sanfilippo C: Acetil-CoA: alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa

Enfermedad de Sanfilippo D: N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa

Enfermedad de Morquio A: N-Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa

Enfermedad de Morquio B: Beta-galactosidasa ácida

40 Enfermedad de Maroteaux-Lamy: Arilsulfatasa B

Enfermedad astuta: Beta-glucuronidasa

Alfa-manosidosis: Alfa-manosidasa ácida

beta-manosidosis: Beta-manosidasa ácida

Fucosidosis: Alfa-L-fucosidasa ácida

Sialidosis: Sialidasa

Enfermedad de Schindler-Kanzaki: Alfa-N-acetilgalactosaminidasa

- 5 En cierto ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para tratar un LSD que comprende administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición/preparación como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la composición/preparación comprende β -glucuronidasa humana recombinante. En otro ejemplo, el LSD es mucopolisacaridosis tipo 7 (es decir, MPS 7, MPS VII o síndrome de Sly), un trastorno que resulta de la deficiencia de β -glucuronidasa. En algunos ejemplos, la β -glucuronidasa humana recombinante alberga un mayor contenido de ácido siálico y es particularmente útil en el tratamiento de un LSD, por ejemplo, MPS 7.
- 10 En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona un método para tratar una afección o trastorno en un sujeto, que comprende administrar un régimen de una composición/preparación como se describe en el presente documento, en la que la administración proporciona un efecto terapéutico estadísticamente significativo para el tratamiento de la afección o trastorno. En algunos ejemplos, el sujeto es humano. En algunos ejemplos, la composición/preparación comprende una glicoproteína recombinante que alberga un mayor contenido de ácido siálico. En un ejemplo, la glicoproteína recombinante tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante.
- 15 En otro ejemplo, la glicoproteína recombinante tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol de la glicoproteína recombinante. En algunos ejemplos, la afección o trastorno se asocia con una deficiencia de enzimas. En un ejemplo, la afección o trastorno asociado con una deficiencia enzimática es un trastorno de almacenamiento lisosomal (LSD).
- 20 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal (LSD) en un sujeto, que comprende administrar un régimen de la composición/preparación como se describe en el presente documento, en la que la administración proporciona un efecto terapéutico estadísticamente significativo para el tratamiento de el LSD. En un ejemplo, la composición/preparación comprende una β -glucuronidasa humana recombinante que alberga un mayor contenido de ácido siálico. En un ejemplo adicional, el LSD es mucopolisacaridosis tipo 7 (es decir, MPS 7, MPS VII o síndrome de Sly).
- 25 De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento del LSD incluye cualquier forma de tratamiento del LSD, por ejemplo, reducir cualquier síntoma de la LSD, reducir la gravedad de cualquier síntoma de la LSD, acortamiento de la duración de uno o más síntomas de la LSD, tratamiento o inhibición de cualquier causa o afección asociada con el LSD, o reducción de cualquier criterio clínico o medición del grado o afección del LSD.
- 30 De acuerdo con la presente divulgación, la β -glucuronidasa humana recombinante se administra en un régimen para el tratamiento de un LSD. En un ejemplo, el LSD es MPS 7. Dicho régimen incluye la dosis por administración, por día, por cada dos semanas, así como el número de dosis por ciclo de tratamiento, o combinaciones de las mismas.
- En general, la β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) se puede administrar en una dosis de aproximadamente 0,1 mg a 20 mg, 0,2 mg a 15 mg, 0,5 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1,5 mg a 8 mg, 2 mg a 6 mg por kg. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra en una dosis de aproximadamente 0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, o alrededor de 12 mg por kg. En un ejemplo, el rhGUS se administra en una dosis de aproximadamente 4 mg por kg. Las dosis se pueden ajustar para la afección de cada paciente, así como para otros medicamentos tomados por el paciente.
- 35 En algunos ejemplos, dicha dosificación se administra cada hora, diariamente, semanalmente (es decir, QW), cada dos semanas (es decir, QOW), o mensualmente.
- 40 En algunos ejemplos, el rhGUS se administra cada hora, aproximadamente cada 1 a 24 horas, 1 a 20 horas, 1 a 16 horas, 1 a 12 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas, 1 a 2 horas o cada hora. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra aproximadamente cada 2, 3, 4, 5 o 6 horas, o se administra aproximadamente cada 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos.
- 45 En algunos ejemplos, el rhGUS se puede administrar por infusión continua. En algunos ejemplos, se puede administrar rhGUS al paciente durante períodos de tratamiento de al menos aproximadamente 2, 4, 6, 10, 12 horas o más, lo que puede mejorar la efectividad en algunos ejemplos. En algunos ejemplos, rhGUS se administra por infusión continua durante 1 a 24 horas, 1 a 20 horas, 1 a 16 horas, 1 a 12 horas, 1 a 10 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas, 1 a 2 horas. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra mediante infusiones continuas durante aproximadamente 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos o 60 minutos. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra por infusión continua durante aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas o más. En un ejemplo, el rhGUS se administra mediante infusión continua durante aproximadamente 4 horas. En algunos ejemplos, los períodos de infusión continua están separados por períodos de no infusión (es decir, períodos en los que no se administra rhGUS). La infusión puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado, tal como por minibomba.
- 50 En algunos ejemplos, los períodos de infusión continua están separados por períodos de no infusión (es decir, períodos en los que no se administra rhGUS). La infusión puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado, tal como por minibomba.
- 55 En algunos ejemplos, el rhGUS se administra aproximadamente cada 1 a 30 días, cada 1 a 25 días, cada 1 a 20 días, cada 1 a 14 días, cada 1 a 10 días, cada 1 a 5 días o diariamente.

5 En algunos ejemplos, el rhGUS se administra durante aproximadamente 1 a 12 semanas, aproximadamente 1 a 24 semanas, aproximadamente 1 a 36 semanas, aproximadamente 1 a 48 semanas, aproximadamente 1 a 60 semanas, o aproximadamente 1 a 72 semanas. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra durante aproximadamente 1 mes, 4 meses, 8 meses, 12 meses, 16 meses, 20 meses o más. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra durante aproximadamente 1 año, 2 años, 5 años, 10 años o más. En algunos ejemplos, el rhGUS se administra permanentemente (es decir, el uso a largo plazo).

10 El rhGUS puede proporcionarse en forma liofilizada y reconstituirse con diluyente estéril (por ejemplo, acuoso) antes de la administración. El rhGUS puede administrarse por cualquier vía eficaz, incluida inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección o infusión intravenosa y administración oral. En ciertos ejemplos, el rhGUS se administra por infusión intravenosa. En general, la dosis programada de rhGUS puede administrarse como una dosis única (por ejemplo, inyección), o puede espaciarse en el transcurso de 24 horas o menos, por ejemplo, mediante infusión continua o inyección repetida de subdosis, o similar o como se describe ampliamente en el presente documento. En un ejemplo, la dosis programada de rhGUS se puede administrar como una inyección única o como inyecciones múltiples.

15 En un ejemplo, el paciente recibe aproximadamente una administración cada dos semanas (es decir, QOW) de rhGUS, a una dosis entre aproximadamente 0,5 y 12 mg (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 4, 8 o 12 mg) por kg para reducir la severidad del LSD. En un ejemplo, el paciente recibe aproximadamente una administración cada dos semanas de rhGUS a una dosis de aproximadamente 4 mg por kg. El régimen puede continuar en algunos ejemplos durante 12, 24, 36, 48 o 60 semanas, o permanentemente (es decir, uso a largo plazo).

20 De acuerdo con la presente divulgación, el rhGUS puede administrarse solo o en combinación con un estándar de atención para el LSD, o como parte del régimen de tratamiento que implica el estándar de atención para el LSD. En algunos ejemplos, a los pacientes se les puede administrar un antihistamínico profiláctico antes de cada infusión de rhGUS. En ejemplos adicionales, a los pacientes se les puede administrar un medicamento antipirético (por ejemplo, ibuprofeno o acetaminofén) antes de cada infusión de rhGUS.

25 Según algunos ejemplos, la administración de rhGUS proporciona un efecto terapéutico estadísticamente significativo. En un ejemplo, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en función de uno o más estándares o criterios proporcionados por una o más agencias reguladoras en los Estados Unidos, por ejemplo, la FDA u otros países. En otro ejemplo, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en función de los resultados obtenidos de un ensayo clínico establecido y/o procedimiento aprobado por la agencia reguladora.

30 En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a un ensayo clínico aleatorio, controlado con placebo, de inicio ciego y de un solo cruce. En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en función de los datos de un diseño de ensayo clínico en el que los sujetos se asignan al azar a uno de 4 grupos, cada uno de los cuales representa una secuencia de tratamiento diferente en diferentes puntos de tiempo predefinidos de manera ciega. En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a los datos de una población de pacientes de al menos 4, 6, 8, 10 o 12 sujetos. En un ejemplo, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina con base en los datos de una población de pacientes de 12 sujetos.

35 En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a un estudio con 12 sujetos asignados al azar 1:1:1:1 a uno de los cuatro grupos de secuencia de tratamiento para comenzar el tratamiento con 4 mg/kg de rhGUS cada dos semanas (es decir, QOW), o placebo y cruzar a 4 mg/kg de rhGUS QOW en diferentes puntos de tiempo predefinidos. En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a un estudio en sujetos a los que se les administró 4 mg/kg de rhGUS o placebo QOW durante 48 semanas.

40 En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a un estudio en el que rhGUS se administra QOW mediante infusión IV lenta durante un período de aproximadamente 4 horas. En algunos ejemplos, los pacientes se medican previamente con antihistamina profiláctica (por ejemplo, cetirizina o loratadina) antes de cada infusión de rhGUS.

45 En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina midiendo los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) como el punto final primario. La extensa investigación realizada durante los últimos 20 años sobre los trastornos por MPS proporciona datos científicos significativos e importantes que permiten calificar los niveles de uGAG como biomarcador que es probable que prediga el beneficio clínico. El proceso de la enfermedad y el mecanismo de acción para el rhGUS en MPS 7 son bien conocidos y los datos de otros trastornos de MPS similares con terapias de reemplazo enzimático comparables (ERT), han establecido que uGAG es un marcador patofisiológico directo y de fácil medición del proceso de la enfermedad MPS y uGAG es un predictor razonable del efecto del tratamiento y del beneficio clínico en los trastornos de MPS. En un ejemplo, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina con base en la determinación de los niveles de uGAG en un estudio clínico con 12 sujetos que han sido tratados con 4 mg/kg de rhGUS o placebo QOW durante un período de 48 semanas.

50 En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina utilizando medidas de eficacia secundarias (es decir, puntos finales secundarios) tales como un índice de respuesta de múltiples dominios y una evaluación de la respuesta clínica individualizada.

En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina utilizando un índice de respuesta de múltiples dominios, que combina análisis independientes de múltiples dominios para asegurar que la base más amplia para la eficacia pueda evaluarse sin la complejidad de tratar de construir puntos finales compuestos calificados. En algunos ejemplos, el índice de respuesta de múltiples dominios proporciona una evaluación de la eficacia de rhGUS en un amplio espectro de características clínicas comúnmente observadas en pacientes con MPS 7.

En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina evaluando la respuesta clínica individualizada (ICR). Esta es una medida de la respuesta de cada sujeto al tratamiento que se selecciona con base en la relevancia de la medida de resultados para las preocupaciones que el sujeto/padre/cuidador ha informado, la capacidad del sujeto para completar la evaluación de resultados clínicos de manera confiable y el grado de deterioro para ese individuo. El uso de un ICR permite evaluar el beneficio clínico de rhGUS al evaluar el cambio en un resultado clínico individualizado previamente especificado que se considera más relevante para cada sujeto y luego determinar una tasa de respuesta general para la población del estudio. En algunos ejemplos, las medidas de eficacia secundarias (es decir, los puntos finales secundarios) pueden incluir la evaluación de los sujetos de tratamiento para detectar signos y síntomas de MPS7 que interfieran más con la vida diaria del sujeto (es decir, la evaluación de problemas clínicos). En algunos ejemplos, la evaluación puede incluir pruebas de la función pulmonar, pruebas de la distancia a caminar, pruebas de la amplitud de movimiento de la flexión del hombro y pruebas de la función motora fina.

En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a los datos con un valor alfa menor o igual a aproximadamente 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01. En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a los datos con un intervalo de confianza mayor o igual al 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina en base a los datos con un valor de p menor o igual a aproximadamente 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01. En algunos ejemplos, el efecto terapéutico estadísticamente significativo se determina tras la aprobación del ensayo clínico de fase III de las composiciones y los métodos proporcionados por la presente divulgación, por ejemplo, por la FDA en los Estados Unidos.

En general, el análisis estadístico puede incluir cualquier método adecuado permitido por una agencia reguladora, por ejemplo, la FDA en los EE. UU. o China o cualquier otro país. En algunos ejemplos, el análisis estadístico incluye análisis no estratificados, análisis de intervalo logarítmico, por ejemplo, de Kaplan-Meier, Jacobson-Truax, Gulliken-Lord-Novick, Edwards-Nunnally, Hageman-Arrindel y modelado lineal jerárquico (HLM) y análisis de regresión de Cox.

En algunos ejemplos, los biomarcadores de almacenamiento lisosomal pueden usarse para predecir la respuesta al tratamiento y/o determinar la eficacia del tratamiento. En algunos ejemplos, se pueden medir los niveles de glicosaminoglicano en orina (uGAG) y se puede emplear una reducción en los niveles de uGAG como indicador de una respuesta positiva al tratamiento. En algunos ejemplos, los niveles elevados del biomarcador uGAG, que luego disminuyen con la administración de rhGUS, son predictivos de la respuesta al tratamiento. En algunos ejemplos, esta información se puede emplear para determinar un régimen de tratamiento (como se describe aquí) para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, MPS 7) utilizando rhGUS. Como tal, la presente divulgación proporciona métodos para determinar un régimen de tratamiento que incluye detectar una disminución en el nivel de un biomarcador de LSD en una muestra biológica de un sujeto tratado con la rhGUS y determinar un régimen de tratamiento de rhGUS basado en una disminución en el nivel de uno o más biomarcadores de LSD en una muestra biológica. En algunos ejemplos, el biomarcador de LSD es uGAG. En algunos ejemplos, un nivel reducido o disminuido de uGAG es indicativo de la respuesta al tratamiento y/o la eficacia del tratamiento con el tratamiento con rhGUS. En algunos ejemplos, la reducción de los niveles de uGAG a un nivel estándar predeterminado es indicativo de un mejor pronóstico de tratamiento con rhGUS.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción y cuantificación de ácido siálico total

La β -glucuronidasa humana recombinante (rhGUS) producida de acuerdo con la presente invención se marcó como GUS CR01. La proteína recombinante se produce a partir de células de ovario de hámster chino (CHO) que se han modificado para expresar y secretar la enzima en el medio de cultivo utilizando un sistema de cultivo con biorreactor.

Los lotes anteriores de β -glucuronidasa (marcados como GUS Lote 43/44) se han producido utilizando la misma línea celular mediante un proceso en el que las células se cultivan unidas a microportadores en un sistema de perfusión continua. Las células generalmente se expanden en medios de crecimiento que contienen suero bovino fetal (FBS). Posteriormente, el FBS se lava y se reemplaza con medios que contienen hidrolizados y el sobrenadante se recolectó en modo de perfusión.

En contraste con los métodos informados anteriormente, GUS CR01 se produjo en un sistema de cultivo en el que las células se cultivan en suspensión en un modo de alimentación por lotes. Otra diferencia es que GUS CR01 se cultivó solo en un medio sin proteínas definido químicamente en lugar de un medio que contenía suero utilizado anteriormente.

Se desarrolló un método para la cuantificación del ácido siálico total en GUS en el departamento de control de calidad de Rentchler Biotechnology (RB) para la prueba de liberación de la sustancia farmacéutica GUS. En este método, los

residuos de ácido siálico se liberan de las estructuras de glicano de rhGUS con hidrólisis ácida. El ácido siálico liberado se marca luego con OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina) y se analiza mediante análisis de HPLC en fase inversa (RP-HPLC). Hasta la fecha, el lote 43/44 y seis lotes de rhGUS producidos por RB se han analizado en RB para el ácido siálico total. Estos resultados (Tabla 1) son consistentes con el resultado observado en GlycoSolutions.

5

Tabla 1. Resultados del análisis de ácido siálico total de GUS

Lote GUS	Método de producción	Ácido Siálico (mol/mol de monómero GUS)
Lote 43/44	Previamente Reportado	0,04
PR01	De acuerdo con la presente divulgación	1,0
PR02	De acuerdo con la presente divulgación	0,7
CR01	De acuerdo con la presente divulgación	1,1
GMP1	De acuerdo con la presente divulgación	1,2
GMP2	De acuerdo con la presente divulgación	1,2
GMP3	De acuerdo con la presente divulgación	1,2

Ejemplo 2: farmacocinética en ratas Sprague Dawley macho

10 En este Ejemplo, las β -glucuronidasas humanas recombinantes producidas de acuerdo con la presente divulgación se compararon con las producidas como se informó anteriormente en la técnica. El objetivo de este estudio fue evaluar la farmacocinética y la distribución tisular de las β -glucuronidasas humanas recombinantes administradas por vía intravenosa como una única infusión de dos horas en ratas Sprague Dawley macho. La velocidad de infusión fue 1/3 del volumen total durante la primera hora, seguido de 2/3 del volumen total en la segunda hora. Este régimen de dosificación se diseñó para simular el régimen de dosificación que se utilizará en los pacientes.

15 Materiales y métodos

Artículos de prueba e infusiones.

Se utilizaron tres artículos de prueba en este estudio: cloruro de sodio al 0,9% como control no enzimático, GUS CR01 y GUS Lote 43/44. Las especificaciones completas para los artículos de prueba se pueden encontrar en la Tabla 2.

Tabla 2. Artículos de prueba

20 Artículo de prueba 1

Nombre: Cloruro de sodio al 0,9% para inyección, USP (solución salina)

Fuente: Baxter Healthcare (Marion, NC)

Propiedades físicas: Líquido claro.

Identificador/Número de lote: C883827

25 Estado de esterilidad: estéril

Condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente

Fecha de expiración: 04/2014

Artículo de prueba 2

Nombre: GUS CR01

30 Fuente: Ultragenyx Pharmaceutical Inc. (Novato, CA)

Cantidad: -32,5 mL

Concentración: 2,0 mg/mL

ES 2 704 923 T3

	Unidades de actividad GUS/mL	10,75 M unidades/mL
	Unidades de actividad específica/mg	5,35 M unidades/mg
	Propiedades físicas:	Líquido claro.
	Identificador/Número de lote:	CR01
5	Condiciones de almacenamiento:	2 a 8°C.
	Fecha de vencimiento:	No se proporciona

Artículo de prueba 3

	Nombre:	GUS Lote 43/44
10	Fuente:	Ultragenyx Pharmaceutical Inc. (Novato, CA)
	Cantidad:	-25 mL
	Concentración:	2,5 mg/mL* (2.18 mg/mL)
	Unidades de actividad GUS/mL	11,4 M unidades/mL
	Unidades de actividad específica/mg	5.23 M unidades/mg
15	Propiedades físicas:	Líquido claro.
	Identificador/Número de lote:	43/44
	Condiciones de almacenamiento:	-60 a -80°C
	Fecha de vencimiento:	No se proporciona

20 Los artículos de ensayo se infundieron en ratas Sprague-Dawley macho a una dosis de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal durante una infusión única que consistía en dos fases de 1 hora. Un tercio de la dosis se infundió durante la primera hora y dos tercios de la dosis se infundieron durante la segunda hora (Tabla 3).

Tabla 3. Números de grupos de ratas, dosis y tasas de infusión

Grupo #	Artículo de prueba	Género	n	Vía administración de la dosis	Concentración de la dosis (mg/mL)	Velocidad de la dosis (mL/min)	Dosis Total (mg/kg)	Dosis real* (mg/kg)
1	Solución salina	M	5	iv	n/a	Primera hora: 0,99	n/a	n/a
						Segunda hora: 1,98		
2	Lote GUS: CR01	M	5	iv	0,203	Primera hora: 0,94	~21	~21
						Segunda hora: 1,87		
3	Lote GUS: 43/44	M	5	iv	0,253	Primera hora: 0,78	~21	~1,71
						Segunda hora: 1,57		

¹ La dosis se basó en el peso corporal promedio de las cinco ratas en cada grupo.

* La dosis para el Lote 43/44 de GUS se basó originalmente en un valor de proteína de 2,5 mg/mL determinado por el ensayo BCA. Si la concentración de proteína se basó en la absorbancia a OD 280 y un coeficiente de extinción de 2,12, la dosis real fue de 84,8% x 2 = 1,7 mg/Kg.

Se tomaron muestras de sangre de cada tratamiento previo de rata y luego a intervalos durante las fases de infusión lenta, infusión rápida e infusión posterior según el programa descrito en la Tabla 4. La sangre se dejó coagular, el suero se separó y se almacenó congelado a -80°C en espera de su envío en hielo seco para su análisis.

Tabla 4. Programa de Infusión y sangrado

Etapa	Intervalo nominal
	Dosis previa
Infusión lenta	2 min después del inicio de la infusión
	10 minutos después del inicio de la infusión
	30 minutos después del inicio de la infusión
	60 minutos después del inicio de la infusión
Infusión rápida	120 minutos después del inicio de la infusión
Después de infusión	2 minutos (después del final de la infusión)
	10 minutos (después del final de la infusión)
	30 minutos (después del final de la infusión)
	60 minutos (después del final de la infusión)
	120 minutos (después del final de la infusión)
	240 minutos (después del final de la infusión)
	480 minutos (después del final de la infusión)
	24 horas (después del final de la infusión)

5

Actividad de GUS en suero

La actividad de la β -glucuronidasa se determinó de la siguiente manera: se mezclaron 25 μ L de suero diluido 1:4 a 1:300 en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,8, y 1 mg/mL de BSA cristalina con 50 μ L de Sustrato de 4-MU- β -D-glucurónido 10 mM en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,8, 1 mg/mL de BSA cristalina. Todas las soluciones se precalentaron a 37°C, se mezclaron y luego se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Los ensayos se detuvieron mediante la adición de 200 μ L de carbonato de glicina, pH 10,5, y se leyeron en un lector de placas Molecular Devices M2^e a longitudes de onda de excitación/emisión de 366/446 nm. La actividad se expresó como 1 unidad = 1 nmol de 4MU liberado/mL/h a 37°C.

10

Actividad de GUS en tejidos

Los tejidos se recolectaron en la autopsia y se colocaron en crioviales, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C en espera de su envío en hielo seco para su análisis. La distribución de la actividad de GUS en los tejidos se evaluó de la siguiente manera. Las muestras de tejido total o parcial se descongelaron y se combinaron con 10 a 20 volúmenes de Tris 25 mM, NaCl 140 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, pH 7,2. Los homogeneizados de tejido se prepararon usando un homogeneizador Kinematica Polytron durante 30 segundos en hielo; los homogeneizados resultantes se congelaron/descongelaron una vez (a -80°C) seguido de sonicación durante 20 segundos con enfriamiento en hielo. Se analizó un volumen total de 25 μ L de cada homogeneizado para la β -glucuronidasa usando 4MU- β -glucurónido como se describió anteriormente. La concentración de proteína de los homogeneizados se determinó mediante el método del ácido bicinánico. Los niveles de β -glucuronidasa en el tejido se expresaron como nmoles de 4MU hidrolizado/h/mg de proteína.

15

20

Resultados y discusión

25 Farmacocinética de GUS CR01 frente a GUS Lote 43/44 en el plasma

La Figura 1 muestra la actividad de la β -glucuronidasa en los sueros de ratas de cada grupo de infusión durante la etapa de infusión lenta, la etapa de infusión rápida y la etapa posterior a la infusión. La curva para el Grupo 1 infundido con solución salina solamente, indica el bajo nivel endógeno de β -glucuronidasa de rata que está presente en los

sueros de estas ratas. El nivel endógeno se ha restado de los valores en los otros dos gráficos de las ratas infundidas con enzima.

5 Los gráficos para GUS CR01 y GUS Lote 43/44 muestran un aumento dependiente del tiempo en los niveles de actividad de la enzima que alcanzan un nivel estable al final del período de infusión lento y luego aumentan de nuevo en forma concomitante con el inicio del período de infusión rápida. Sin embargo, por el contrario, GUS CR01 alcanza un nivel en el suero 2 veces más alto al final de la infusión lenta y 3 veces más alto al final del período de infusión rápida en comparación con GUS lote 43/44. También se puede observar en la Figura 1 que cesa la rápida eliminación de ambas enzimas del suero después de las infusiones, lo que es característico de las enzimas lisosomales en general.

10 En la Figura 2, se presenta la fase de eliminación posterior a la infusión para ambas enzimas a partir de las cuales se calcularon los valores $t_{1/2}$. GUS lote 43/44 se elimina de la circulación con una primera fase $t_{1/2}$ de 4,50 minutos. Por el contrario, GUS CR01 se elimina a la $t_{1/2}$ un poco más lenta, de 5,30 minutos. Los datos brutos de eliminación se analizaron mediante un método diferente para volver a calcular los valores de $t_{1/2}$ (Figura 4A y B). La $C_{m\acute{a}x}$ (14.800 para GUS CR01 frente a 4.300 para GUS lote 43/44) y el AUC-t (18.700 frente a 5.580) también se muestran 3 veces más altas para GUS (Tabla 5). El $t_{1/2}$ se calculó de manera muy diferente ya que solo se tuvo en cuenta la segunda fase. Para GUS CR01, la segunda fase de $t_{1/2}$ es 1,1 horas y 0,967 horas para GUS lote 43/44 (Tabla 5).

Tabla 5

Grupo	Animal	$C_{m\acute{a}x}$ (unidades/mL)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	AUC0-t (h*Unidades/mL)	AUC0-inf (h*Unidades/mL)	Vida media (h)	Eliminación min*Unidades /mL)/(mg/kg)	Vz (Unidades /mL)/(mg/kg)
Grp 26-10 CR01	2-6	12.900	0	15.300	15.500	2,05	2,19E-06	0,000389
	2-7	14.200	0	16.900	16.900	0,794	2,01E-06	0,000138
	2-8	14.200	0	18.300	18.400	0,926	1,84E-06	0,000148
	2-9	16.700	0	22.800	23.000	1,03	1,47E	0,000132
	2-10	16.000	0	20.300	20.300	0,67	1,66E-06	9,65E-05
	Media	14.800	0	18.700	18.800	1,1	1,84E-06	0,000181
	CV%	10,4		15,7	15,7	50,5	15,3	65,4
	Media geométrica	14.800		18.500	18.600	1,01	1,82E-06	0,000159
Grp 311-1543/44	3-11	4.640	0	5.380	5.380	0,677	6,26E-06	0,000367
	3-12	7.000	0,03	6.940	6.950	0,832	4,84E-06	0,000349
	3-13	4.870	0	6.220	6.250	1,02	5,38E-06	0,000476
	3-14	2.740	0,03	5.420	5.430	1,39	6,20E-06	0,000747
	3-15	2.270	0	3.970	3.980	0,913	8,45E-06	0,000668
	Media	4.300	0,0133	5.580	5.600	0,967	5,23E-06	0,000521
	CV%	44	136,9	19,9	19,8	27,8	22,1	34,4
	Media geométrica	3.970		5.490	5.510	0,939	6,11E-06	0,000497

Distribución en el tejido de GUS CR01 frente a GUS lote 43/44

Además de la eliminación de las dos enzimas, se evaluó la distribución en el tejido de GUS CR01 en comparación con GUS lote 43/44 en hígado, bazo, corazón, riñón, cerebro y pulmón. Los extractos de tejido preparados a partir de cada uno de estos tejidos se analizaron para determinar la β -glucuronidasa y la proteína como se describe en los métodos. Los resultados de los ensayos se expresaron como unidades de actividad de β -glucuronidasa/mg de proteína tisular. El resumen de estos ensayos se puede observar en la Figura 4. En cada uno de los gráficos de esta figura, los niveles de enzimas totales que incluyen la β -glucuronidasa endógena en rata se muestran en el lado izquierdo. En el lado derecho de cada gráfico, el nivel promedio de enzima endógena se ha restado del nivel total de enzima. El nivel promedio de β -glucuronidasa endógena de cada tejido se calculó utilizando los valores de las cinco ratas del Grupo 1 infundido con solución salina.

En cada tejido, el nivel de GUS en ratas infundidas con GUS CR01 o GUS lote 43/44 es más alto que las ratas infundidas con solución salina. Cuando se restan los niveles de GUS endógenos, se hace evidente que las ratas infundidas con GUS CR01 contienen niveles de GUS que son al menos dos veces mayores que las ratas infundidas con el GUS lote 43/44.

Este estudio se diseñó para evaluar las propiedades farmacocinéticas de β -glucuronidasa y la distribución tisular de GUS CR01 y GUS lote 43/44. El estudio actual determinó que GUS CR01 se eliminó de la circulación con una primera fase de $t_{1/2}$ de 5,30 minutos, en comparación con un $t_{1/2}$ más rápido de 4,50 minutos para GUS lote 43/44. La segunda fase de $t_{1/2}$ también es un poco más grande para GUS CR01.

Se demostraron diferencias más significativas entre las 2 enzimas para la $C_{m\acute{a}x}$, el AUC-t y la distribución tisular. La concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de la actividad de β -glucuronidasa en el suero al final del período de infusión de dos horas para GUS CR01 fue de 14.829 unidades/mL, 4,2 veces la concentración de 3.537 unidades/mL alcanzada por GUS lote 43/44. Este aumento en $C_{m\acute{a}x}$ podría explicarse por la acumulación de la enzima que se elimina más lentamente a una mayor concentración en la sangre durante el período de infusión. El AUC-t también se incrementó en gran medida (más de 3 veces) con GUS CR01 en comparación con GUS lote 43/44, como se representa en la Figura 1.

Por último, pero no menos importante, se observa que en todos los tejidos analizados se administró GUS CR01 a los tejidos en niveles de hasta dos veces o más que el del GUS lote 43/44. Se sabe que cambiar las características de eliminación de una enzima lisosomal de la circulación tiene un efecto en la distribución tisular. Es posible que la desaceleración del $t_{1/2}$ de GUS CR01 en la circulación permitiría una distribución más eficiente de la enzima a los tejidos seleccionados. Más importante aún, los cambios en la distribución tisular parecen correlacionarse muy bien con los cambios de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC-t. Como se puede observar en la Figura 3, las barras de error son bastante grandes, lo que refleja un amplio rango de valores obtenidos en las ratas individuales de cada grupo de estudio. La repetición de los ensayos de β -glucuronidasa por triplicado en tejidos seleccionados confirmó los valores originales, lo que nos lleva a creer que la amplia gama de valores observados en estas ratas eran reales.

Anteriormente, el análisis de GUS CR01 ha demostrado que mientras que el nivel de manosa-6-fosfato y la mayoría de las otras propiedades son bastante similares entre las 2 enzimas, el contenido de ácido siálico de GUS CR01 es 28 veces mayor que el de GUS lote 43/44 (1,1 mol/mol de monómero GUS frente 0,04 mol/mol de monómero GUS). Véase la Tabla 6.

Tabla 6. Características de GUS CR01 y GUS lote 43/44

Característica/Ensayo	Unidades	GUS CR01	GUS lote 43/44	GMP1	GMP2	GMP3*
Título	mg/L	~ 400	~50	~ 400	~ 400	~ 400
pH	$-\log [H^+]$	7,4	7,5	7,4	7,6	6,0
Pureza(Reducción de SDS-PAGE)	%	99,2	>95,0	99,2	98,8	99,3
Tetrámero (SE-HPLC)	%	97,7	99,0	98,4	98,6	99,1
Peso molecular del Tetrámero	Daltons	290.249	300.000	300.000	300.000	300.000
Coeficiente de extinción de masa	$(\text{mg/mL})^{-1}$ cm^{-1}	2,08	-	2,0	2,0	2,1

Heterogeneidad de carga (IEF)	Intervalo de pH	comparable	6,6-7,7	comparable	comparable	comparable
Análisis del N-Glicano M6P (suma de picos 15-17)	% en moles	14,2	comparable	14	14	12
Contenido de ácido siálico	(moles/mol de monómero)	1,1	0,04	1,2	1,2	1,2
Actividad específica	(MU/mg)	3,6	3,70	3,9	3,7	3,5
Captación celular	Captación nM	1,2 - 1,7	1,4	1,8	1,6	1,4
Vida media en Fibroblastos de MPS7	Días			NA	NA	NA
	0-21d	20,0	18,9			
	5-21d	21,6	20,5			

* El análisis de monosacáridos indicó que el 71% de los residuos de galactosa en GMP3 GUS están sialilados.

- Al juntar los datos, se hace bastante evidente que la mejor distribución tisular de GUS CR01 demostrada en el presente documento se debe a su aumento en el contenido de ácido siálico, ya que se sabe que el ácido siálico retarda la eliminación de glicoproteínas de la circulación por los receptores de manosa ubicados en las células endoteliales en las paredes interiores de los vasos sanguíneos. La combinación de niveles altos de ácido siálico y restos de manosa-6-fosfato de alta afinidad proporciona una combinación óptima para reducir la captación en el tejido a través de otros receptores de carbohidratos debido al alto contenido de ácido siálico, asegurando concentraciones más altas en la circulación y luego logrando una excelente captación tisular en los tejidos objetivo. debido a la alta afinidad de los niveles de manosa-6-fosfato.
- 5
- 10 Ejemplo 3: Tratamiento de MPS VII usando terapia de reemplazo enzimático
- El propósito de este ejemplo es demostrar que la terapia de reemplazo enzimático para la mucopolisacaridosis tipo VII (es decir, MPS VII; Síndrome de Sly) usando β -glucuronidasa humana producida de forma recombinante (rhGUS) reduce el almacenamiento lisosomal en un estudio clínico de 36 semanas.
- 15 En este ejemplo, tres sujetos diagnosticados con MPS VII se les administró rhGUS con un mayor contenido de ácido siálico. La dosificación se realizó de acuerdo con el siguiente programa de 36 semanas:
- Semanas 1-12: 2 mg/kg cada dos semanas;
- Semanas 13-20: 1 mg/kg cada dos semanas;
- Semanas 21-28: 4 mg/kg cada dos semanas; y
- Semanas 29-36: 2 mg/kg cada dos semanas.
- 20 La seguridad y la eficacia de rhGUS se evaluaron durante el programa de tratamiento de 36 semanas. El compuesto rhGUS parecía ser seguro y bien tolerado. Es importante destacar que no se observaron eventos adversos graves hasta las 36 semanas y no hubo reacciones asociadas relacionadas con el fármaco o de infusión de hipersensibilidad en ninguno de los tres sujetos.
- 25 Para medir la eficacia, primero se evaluaron los niveles urinarios y séricos de glicosaminoglicanos (GAG), ya que la acumulación lisosomal de GAG es un sello distintivo de la deficiencia de GUS. Se observó una reducción dependiente de la dosis rápida y sostenida en glicosaminoglicano en orina (uGAG) en sujetos tratados con rhGUS. Véase la Figura 4. La reducción media en uGAG al final de cada intervalo de dosificación se muestra en la Figura 5 e ilustra que una dosis de 4 mg/kg resultó en la mayor reducción de los niveles de uGAG.
- 30 También se observó una reducción progresiva en glicosaminoglicanos en suero (GAG) en los tres sujetos tratados con rhGUS. En particular, cada sujeto demostró al menos una reducción del 25% en los niveles de GAG en suero al final del programa de tratamiento de 36 semanas. Véase la Figura 6.
- Finalmente, se evaluó el tamaño del hígado en sujetos tratados con rhGUS, ya que el tamaño agrandado del hígado se observa con frecuencia en pacientes que padecen MPS VII. Hubo una reducción significativa en la hepatomegalia como resultado del protocolo de tratamiento de 36 semanas. Véase la Figura 7.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente solicitud. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o en la prueba de la presente solicitud, en este documento se describen métodos y materiales representativos.

5 Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación como se conocen dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y se pueden aplicar a las características esenciales expuestas anteriormente y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 En la descripción de las realizaciones de la presente solicitud, se emplea una terminología específica por motivos de claridad. Sin embargo, la invención no pretende limitarse a la terminología específica así seleccionada. Todos los ejemplos presentados son representativos y no limitativos. Las realizaciones descritas anteriormente pueden modificarse o variarse, sin apartarse de la invención, como apreciarán los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas anteriores.

Listado de secuencias

<110> ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.

Jungles, Steven

20 Morris, Gabrielle

Grubb, Jeff

Vellard, Michael

Kakkis, Emil D.

<120> COMPOSICIONES DE GLICOPROTEÍNAS SIALILADAS Y USOS DE LAS MISMAS

25 <130> ULPI-020/02WO

<150> US 62/114.313

<151> 2015-02-10

<150> US 61/948.421

<151> 2014-03-05

30 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 629

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> beta-glucuronidasa humana recombinante

<400> 1

ES 2 704 923 T3

Leu Gln Gly Gly Met Leu Tyr Pro Gln Glu Ser Pro Ser Arg Glu Cys
 1 5 10 15
 Lys Glu Leu Asp Gly Leu Trp Ser Phe Arg Ala Asp Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Arg Arg Arg Gly Phe Glu Glu Gln Trp Tyr Arg Arg Pro Leu Trp Glu
 35 40 45
 Ser Gly Pro Thr Val Asp Met Pro Val Pro Ser Ser Phe Asn Asp Ile
 50 55 60
 Ser Gln Asp Trp Arg Leu Arg His Phe Val Gly Trp Val Trp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Ile Leu Pro Glu Arg Trp Thr Gln Asp Leu Arg Thr Arg
 85 90 95
 Val Val Leu Arg Ile Gly Ser Ala His Ser Tyr Ala Ile Val Trp Val
 100 105 110
 Asn Gly Val Asp Thr Leu Glu His Glu Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Glu
 115 120 125

ES 2 704 923 T3

Ala Asp Ile Ser Asn Leu Val Gln Val Gly Pro Leu Pro Ser Arg Leu
130 135 140

Arg Ile Thr Ile Ala Ile Asn Asn Thr Leu Thr Pro Thr Thr Leu Pro
145 150 155 160

Pro Gly Thr Ile Gln Tyr Leu Thr Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Lys Gly
165 170 175

Tyr Phe Val Gln Asn Thr Tyr Phe Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Leu
180 185 190

Gln Arg Ser Val Leu Leu Tyr Thr Thr Pro Thr Thr Tyr Ile Asp Asp
195 200 205

Ile Thr Val Thr Thr Ser Val Glu Gln Asp Ser Gly Leu Val Asn Tyr
210 215 220

Gln Ile Ser Val Lys Gly Ser Asn Leu Phe Lys Leu Glu Val Arg Leu
225 230 235 240

Leu Asp Ala Glu Asn Lys Val Val Ala Asn Gly Thr Gly Thr Gln Gly
245 250 255

Gln Leu Lys Val Pro Gly Val Ser Leu Trp Trp Pro Tyr Leu Met His
260 265 270

Glu Arg Pro Ala Tyr Leu Tyr Ser Leu Glu Val Gln Leu Thr Ala Gln
275 280 285

Thr Ser Leu Gly Pro Val Ser Asp Phe Tyr Thr Leu Pro Val Gly Ile
290 295 300

Arg Thr Val Ala Val Thr Lys Ser Gln Phe Leu Ile Asn Gly Lys Pro
305 310 315 320

Phe Tyr Phe His Gly Val Asn Lys His Glu Asp Ala Asp Ile Arg Gly
325 330 335

Lys Gly Phe Asp Trp Pro Leu Leu Val Lys Asp Phe Asn Leu Leu Arg
340 345 350

Trp Leu Gly Ala Asn Ala Phe Arg Thr Ser His Tyr Pro Tyr Ala Glu
355 360 365

Glu Val Met Gln Met Cys Asp Arg Tyr Gly Ile Val Val Ile Asp Glu

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una glicoproteína recombinante, en la que la glicoproteína recombinante es β -glucuronidasa humana y tiene un contenido de sialilación de al menos 0,7 mol/mol de la glicoproteína recombinante.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la glicoproteína recombinante tiene un contenido de sialilación de al menos 1 mol/mol y un alto nivel de restos de M6P de al menos 10% en moles del glicano total de la glicoproteína recombinante.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante comprende la SEQ ID NO: 1.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante tiene un contenido de sialilación de aproximadamente 0,8 mol/mol a aproximadamente 1,3 mol/mol.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante tiene un contenido de sialilación de aproximadamente 1,0 mol/mol a aproximadamente 1,2 mol/mol.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosomal en un sujeto que lo necesite.
- 15 7. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el sujeto es un ser humano.
8. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el trastorno de almacenamiento lisosomal es mucopolisacaridosis tipo 7.
9. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra a una dosis de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg.
- 20 10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, o aproximadamente 4 mg/kg.
11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra semanalmente.
- 25 12. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra cada dos semanas.
13. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra por vía intravenosa.
- 30 14. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra por infusión continua.
15. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la β -glucuronidasa humana recombinante se administra concurrentemente con o después de la terapia con antihistamínicos.

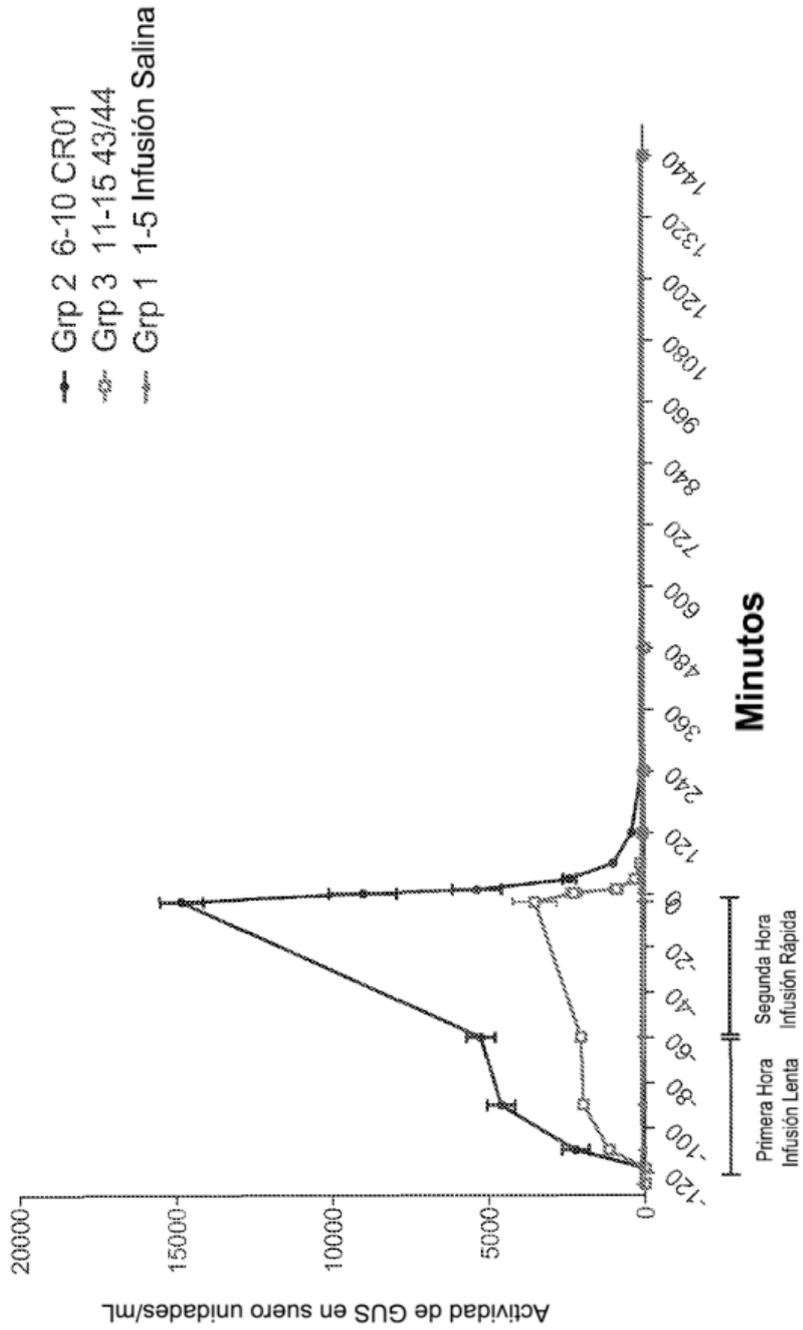


FIGURA 1

FIGURA 2

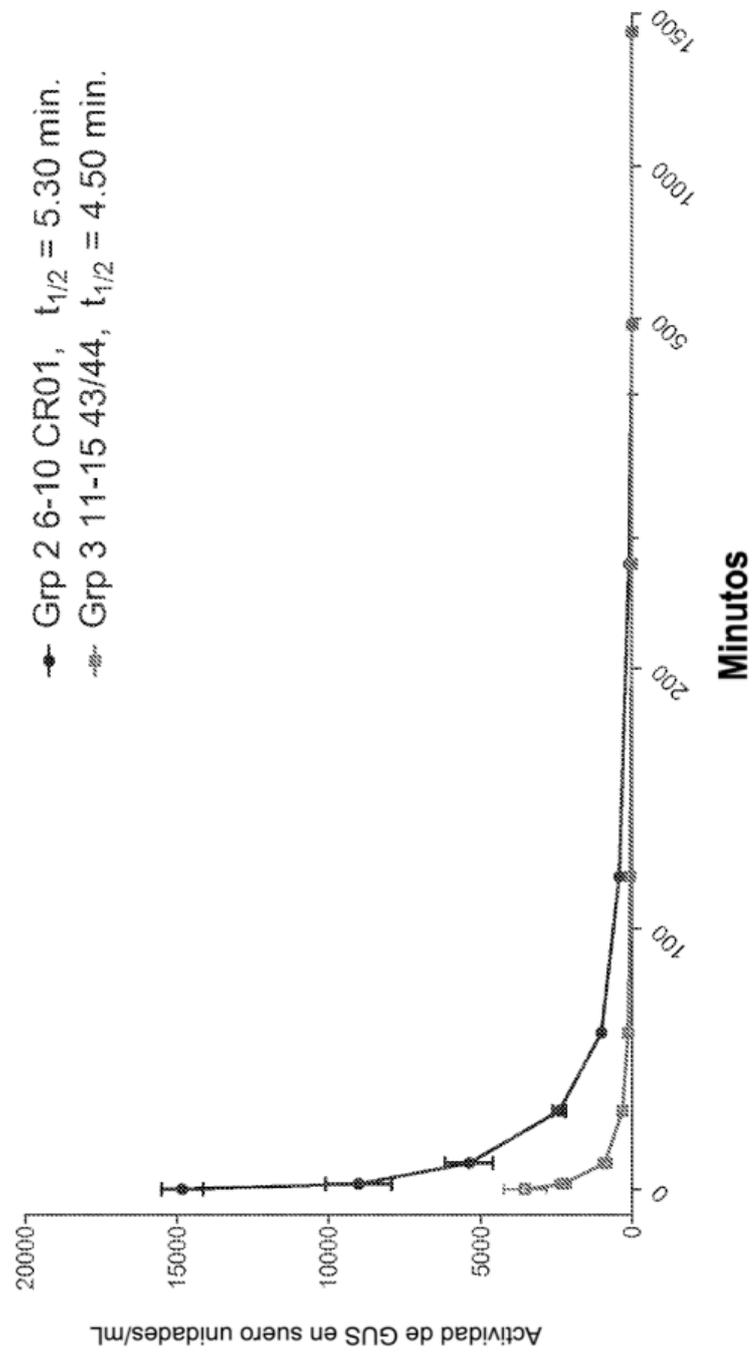


FIGURA 3

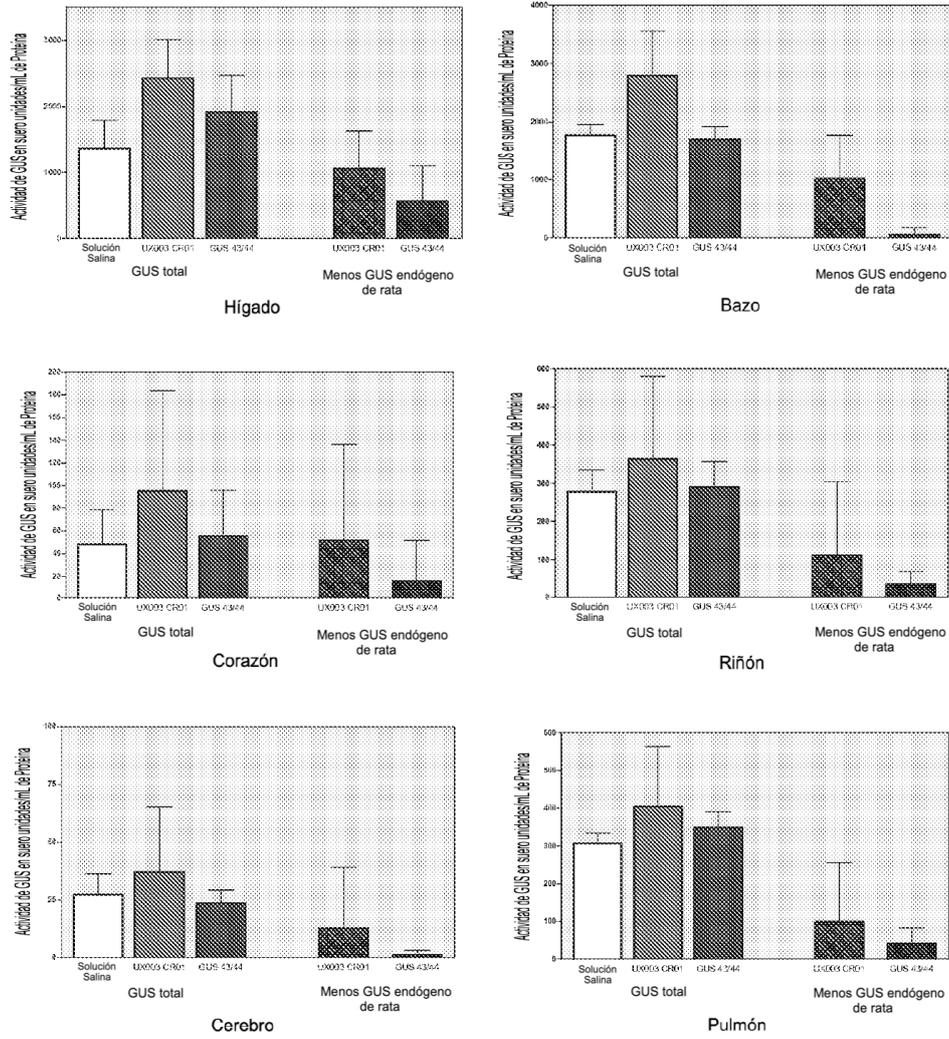


FIGURA 4

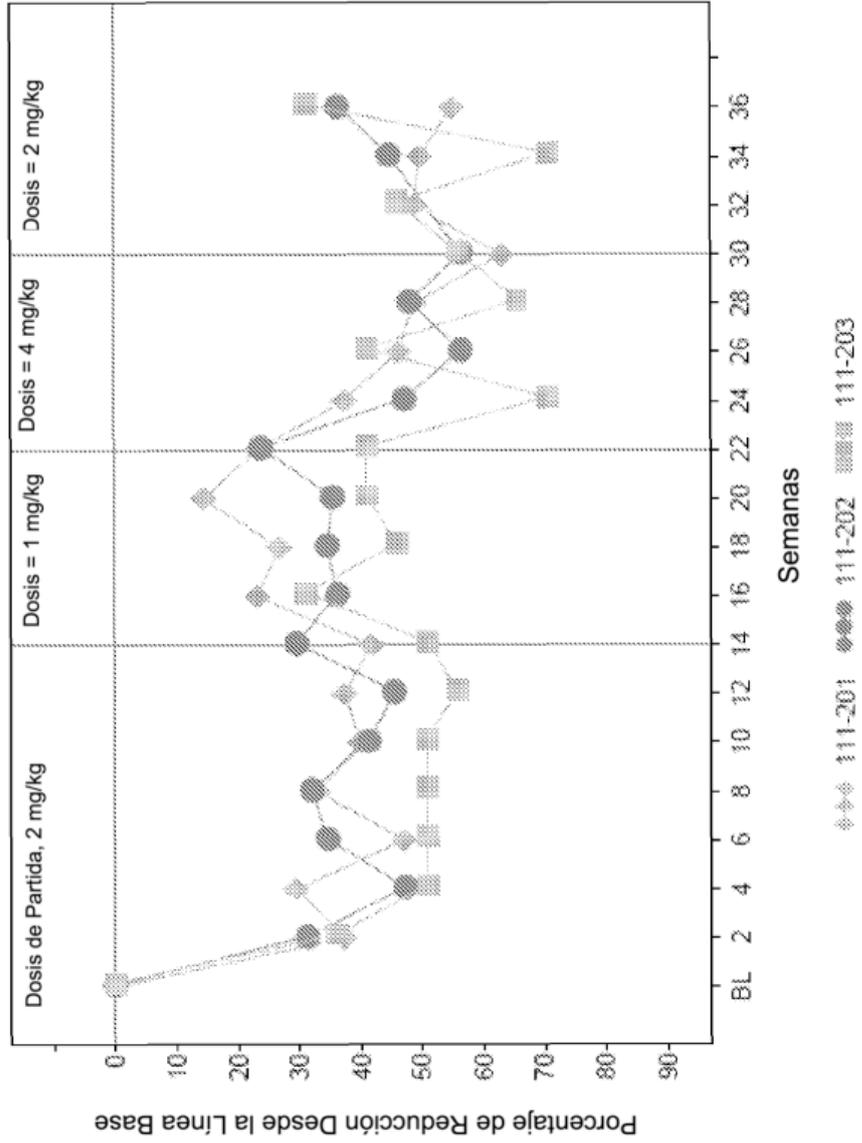


FIGURA 5

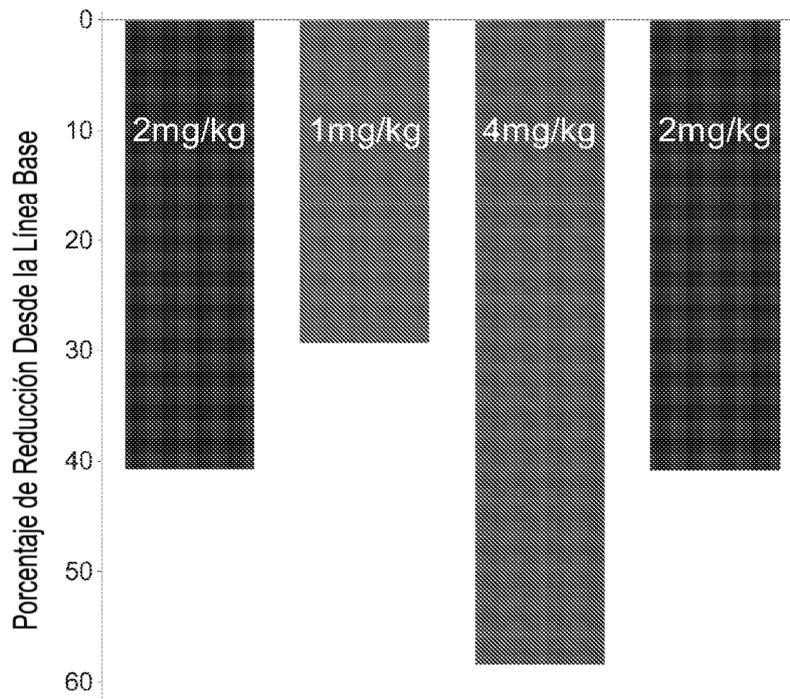


FIGURA 6

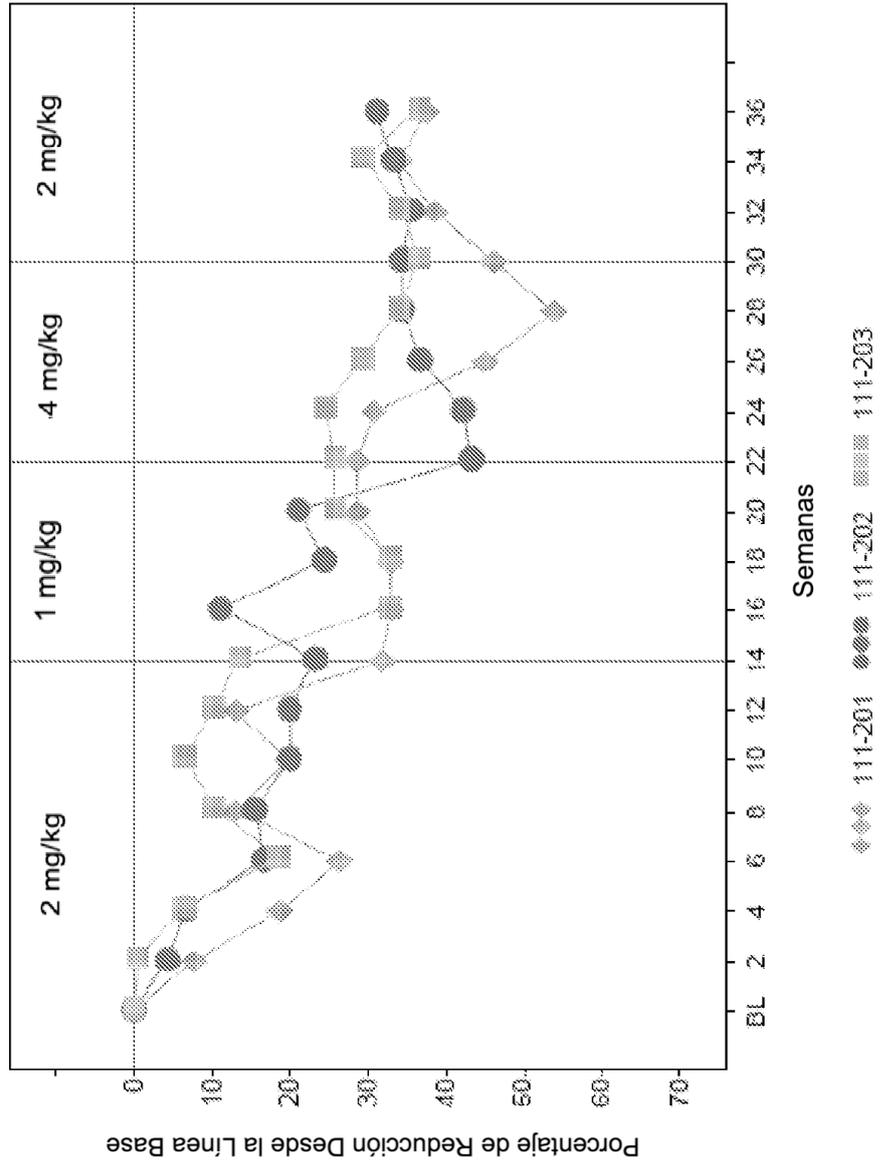
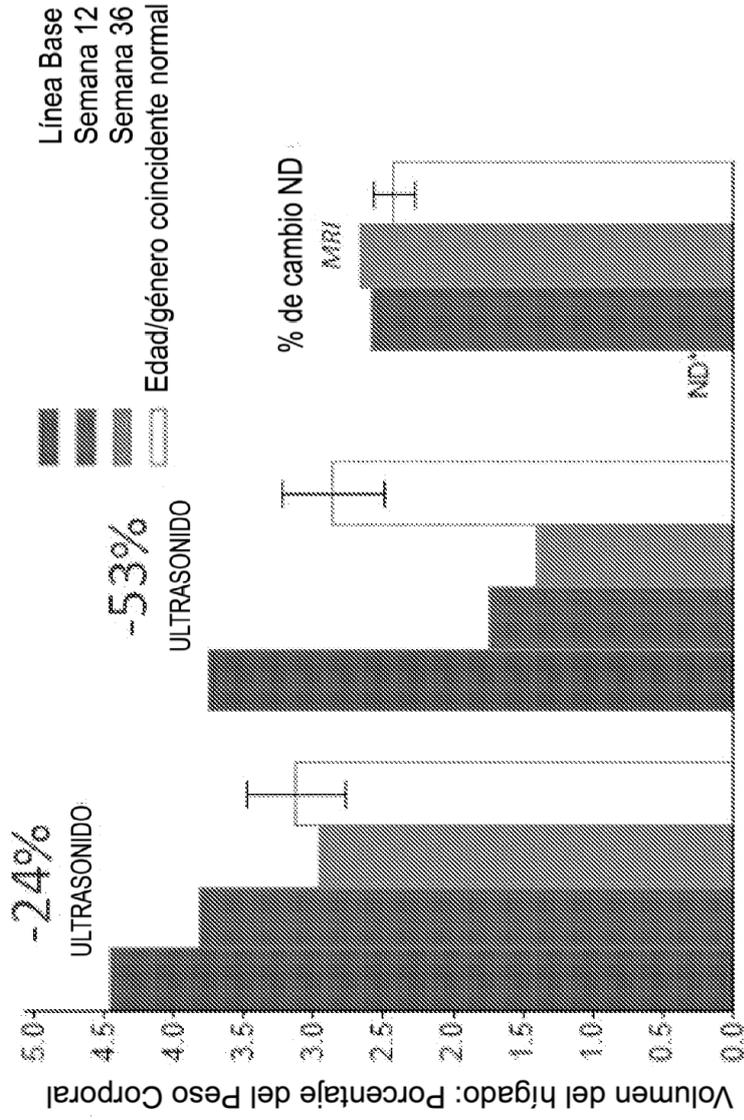


FIGURA 7



*El barrido de línea base no de determinó (ND); subjetivamente el radiólogo no reporta cambio de BL para la semana 12