

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 594**

51 Int. Cl.:

A61K 35/54 (2015.01)

A61K 38/47 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027818**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14764160 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2976092**

54 Título: **Reticuladores químicos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361794784 P

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

08.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DO, HUNG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 804 594 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

Reticuladores químicos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Las invenciones divulgadas se refieren en general a composiciones y métodos para reticulación química.

5 ANTECEDENTES

Los lisosomas son organelos intracelulares especializados donde proteínas, varios lípidos (incluidos glicolípidos y colesterol) y carbohidratos se degradan y reciclan a sus constituyentes primarios que permiten la síntesis de nuevas proteínas, componentes de membrana y otras moléculas. Los lisosomas también son utilizados por las células para ayudar a mantener la homeostasis y la salud celular a través de un proceso celular adaptable conocido como autofagia que aumenta la actividad lisosomal para proporcionar aminoácidos adicionales para una mayor biosíntesis de varias proteínas (por ejemplo, anticuerpos e interferones) y para suministrar nutrientes para la producción de energía que les permita lidiar con períodos estresantes de privación de nutrientes o infecciones virales. Cada proceso metabólico es catalizado por una enzima lisosomal residente específica. Las mutaciones genéticas pueden provocar deficiencias en las actividades biológicas lisosomales que alteran los procesos metabólicos y conducen a enfermedades clínicas. Los trastornos de almacenamiento lisosomal (LSD) son una clase de aproximadamente 50 enfermedades humanas diferentes provocadas por una deficiencia de proteínas lisosomales específicas que resulta en la acumulación de varias sustancias dentro de los compartimientos endosomales/lisosomales. Muchas de estas enfermedades han sido bien caracterizadas para entender la proteína lisosomal deficiente y el defecto metabólico resultante. Por ejemplo, hay varios LSD de catabolismo glucolipídico alterado tales como Gaucher, Fabry y Tay-Sachs/Sandhoff. Neimann-Pick C se caracteriza por un metabolismo alterado de lípidos y colesterol, mientras que también se han caracterizado enfermedades del metabolismo de carbohidratos alterado tales como enfermedades de almacenamiento de glucógeno tipo II (Pompe) y tipo III (Corey-Forbes). Otros LSD alteran el metabolismo de las matrices óseas o extracelulares [por ejemplo, mucopolisacáridos (MPS I-VII), Gaucher] y recambio de proteínas (lipofuscinosis ceroidea neuronal; Batten, etc.). Si bien los LSD son relativamente poco comunes, pueden provocar enfermedad crónica grave y a menudo la muerte si no se tratan efectivamente.

No se conoce una cura para las enfermedades de almacenamiento lisosomal pero se han investigado varios abordajes de tratamiento diferentes para diversos LSD, incluido el trasplante de médula ósea y sangre del cordón umbilical, la terapia de reemplazos de enzimas (TRE), la terapia de reducción de sustrato (TRS) y la terapia de chaperonas farmacológicas. También se está desarrollando una terapia genética pero no se ha probado clínicamente. De estos abordajes de tratamiento, la TRE es la que está más establecida con múltiples TRE aprobadas para el tratamiento de varios LSD, entre los que se encuentran Gaucher, Fabry, Pompe, MPS I, MPS II y MPS VI, mientras que se ha aprobado un fármaco de SRT para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

El concepto de TRE para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal es bastante simple, donde una enzima lisosomal humana recombinante se administra en pacientes para complementar la actividad biológica deficiente y mejorar los síntomas clínicos. Sin embargo, a diferencia de otros tratamientos terapéuticos de proteínas que funcionan principalmente en la superficie de la célula o fuera de las células (por ejemplo, anti-VEGF y otros anticuerpos, eritropoyetina, factores de coagulación, etc.), las enzimas lisosomales deben funcionar dentro de las células, dentro de los lisosomas, y, por lo tanto, usan un mecanismo para entrar a las células desde el exterior y para su entrega posterior a estos compartimientos internos. En los mamíferos, las estructuras de carbohidratos ramificadas en la estructura principal de las proteínas en ciertos residuos de asparagina (oligosacáridos conectados a N; N-glicanos) para la mayoría de las enzimas lisosomales solubles se modifican postraslacionalmente para formar una estructura de carbohidratos especializada llamada 6-fosfato de manosa (M6P). M6P es la señal biológica natural para identificación y transporte de las proteínas lisosomales recientemente sintetizadas del aparato de Golgi a los lisosomas por medio de receptores de M6P unidos a la membrana. Una clase de receptores de M6P (receptor de M6P independiente de cationes; CI-MPR) también se cicla con la membrana plasmática y es funcionalmente activa para la unión e internalización de proteínas lisosomales exógenas. Se cree que el CI-MPR ha evolucionado para recapturar las proteínas lisosomales que escaparon de las células (por medio de la secreción fuera de las células) y, de esta forma, proporciona un mecanismo de direccionamiento para internalizar las proteínas lisosomales exógenas y es la base de la terapia de reemplazo de enzimas para varios LSD.

Se ha demostrado que las terapias de reemplazo de enzimas lisosomales recombinantes generalmente son seguras pero su efectividad para reducir los síntomas clínicos varía ampliamente. Por ejemplo: TRE de Fabrazyme™ (α -galactosidasa A ácida recombinante; Genzyme Corp.) dosificada a 1 mg/kg de peso corporal una vez cada dos semanas es suficiente para limpiar el sustrato acumulado de las células endoteliales en la enfermedad de Fabry, mientras que 40 mg/kg de Myozyme™ (α -glucosidasa ácida humana recombinante, rhGAA; Genzyme Corp.) dosificada cada dos

semanas solo es moderadamente efectiva para la enfermedad de Pompe. La eficacia dispar se atribuye principalmente a diferencias en el contenido de M6P de forma tal que los niveles bajos de M6P se correlacionen con un mal direccionamiento y baja eficacia de los fármacos. La fabricación de enzimas lisosomales recombinantes es muy desafiante dado que es extremadamente difícil controlar el procesamiento de carbohidratos, particularmente el nivel de M6P en sistemas de expresión de mamíferos. Dos enzimas de Golgi especializadas catalizan la modificación del M6P; la N-acetilglucosamina fosfotransferasa agrega N-acetilglucosaminita conectada a fosfato a ciertos residuos de manosa terminales, mientras que la N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster α -N-acetilglucosaminidasa (también conocida como Enzima de Descubrimiento) elimina la cobertura de N-acetilglucosamina para revelar la señal de M6P. Sin embargo, la fosfotransferasa de N-acetilglucosamina es limitada en células y esta reacción bioquímica es inherentemente ineficiente para varias proteínas lisosomales. La sobreexpresión de las proteínas lisosomales durante el proceso de fabricación exagera en gran medida este problema y conduce a cantidades altamente variables de M6P. Por consiguiente, el procesamiento de los carbohidratos normalmente es incompleto y conduce a la producción de enzimas lisosomales recombinantes con mezclas de N-glicanos que contienen M6P, estructuras que no sean de M6P de N-glicanos tipo alta manosa y N-glicanos de tipo complejo (típicos para proteínas no secretoras). Para complicar las cosas, las células muertas o dañadas liberan enzimas tales como fosfatasas al medio de cultivo celular que elimina M6P. Por lo tanto, un contenido más bajo de M6P disminuye la afinidad de unión de una enzima lisosomal recombinante para receptores de M6P y disminuye su captación celular y, por ende, reduce la eficacia del fármaco. Las células muertas o dañadas liberan otras glucosidasas que eliminan otros carbohidratos (por ejemplo, ácidos siálicos, galactosa, etc.) para revelar los carbohidratos internos que normalmente no se exponen y estos N-glicanos se identifican fácilmente como aberrantes. Estas estructuras de N-glicano incompletas aumentan la tasa de eliminación de proteínas lisosomales de la circulación, lo que también puede reducir la eficacia del fármaco. Por lo tanto, son necesarias dosis más altas de fármaco para compensar la eficacia reducida. Sin embargo, requisitos de dosis de fármaco más altas tienen múltiples implicaciones negativas: (1) una dosis de fármaco más alta podría tener un costo prohibitivo al aumentar un tratamiento que ya era costoso; (2) dosis más altas del fármaco requieren tiempos de infusión largos; (3) grandes cantidades de fármaco circulante resultan en una respuesta importante de los anticuerpos (que se observa en la mayoría de los pacientes con Pompe) y numerosos pacientes también han experimentado reacciones alérgicas durante las infusiones. La FDA ha emitido una "advertencia de color negro" para la Miozima y el fármaco normalmente se administra muy lentamente al principio pero se va aumentando con el transcurso de la infusión. Esta estrategia ayuda a mitigar las respuestas alérgicas pero ralentiza considerablemente los tiempos de infusión donde infusiones de 12 horas no son poco comunes.

Una posible estrategia para mejorar el direccionamiento del fármaco para varias TRE emplea un péptido de direccionamiento para dirigir eficientemente las TRE a los lisosomas sin que sean necesarias las estructuras de carbohidratos de M6P tradicionales. Esto es viable desde el punto de vista conceptual, dado que el receptor de M6P independiente de cationes contiene un dominio de unión distinto para un pequeño péptido denominado factor de crecimiento 2 similar a la insulina (IGF-2) y este receptor se conoce, por lo tanto, como el IGF-2/ (IGF-2/CI-MPR). De hecho, este receptor es responsable exclusivamente de la internalización de las proteínas lisosomales que contienen M6P debido a que el IGF-2/CI-MPR está presente y es biológicamente activo en la superficie celular. La otra clase de receptores de M6P, el receptor M6P dependiente de cationes (CD-MPR), solo participa en el transporte de proteínas lisosomales dentro de las células, dado que no es biológicamente activo en las superficies celulares y carece del dominio de unión al péptido IGF-2. El IGF-2/CI-MPR tiene dos sitios de unión separados para M6P (dominios 1-3 y 7-9, respectivamente) de forma que se une a un mono-M6P N-glicano (1 residuo de M6P en N-glicano) con afinidad moderada o un bis-M6P N-glicano (dos residuos de M6P en el mismo N-glicano) con una afinidad aproximadamente 3000 veces más alta. Dado que las proteínas lisosomales contienen mezclas de mono- o bis-M6P N-glicanos complejos (que no son M6P), sus afinidades por el IGF-2/CI-MPR varían ampliamente dependiendo del tipo y la cantidad de N-glicanos que contienen M6P.

El documento WO2012/166653 se refiere a métodos para acoplar péptidos en enzimas lisosomales recombinantes. El documento ejemplifica el acoplamiento por medio de enlazantes tales como succinimidil 6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic), que reacciona con grupos amina en la enzima lisosomal para producir un resto de hidrazina que, a su vez, reacciona con un péptido de direccionamiento modificado por aldehído para obtener un resto acoplado que tiene un enlazante de hidrazona. Sigue siendo necesario desarrollar otras estrategias para crear proteínas unidas a IGF-2 para un direccionamiento mejorado de proteínas. Siguen siendo necesarios constructos que mantengan la conformación correcta de proteínas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Se divulga en la presente un método de realización de un péptido de direccionamiento lisosomal modificado que comprende:

- a. poner en contacto el factor de crecimiento similar a la insulina 2 variante (vIGF2) con un agente reticulador bifuncional para introducir un grupo de hidrazida protegido en el residuo N-terminal;

b. desproteger el vIGF2 modificado por hidrazida en solución para formar un vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido;

c. poner en contacto una enzima lisosomal con un primer agente de reticulación para introducir grupos aldehído;

d. reticular al menos un vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido con la enzima lisosomal;

5 en donde:

el vIGF2 comprende uno o más de los siguientes cambios en comparación con la secuencia de IGF2 humana de tipo natural:

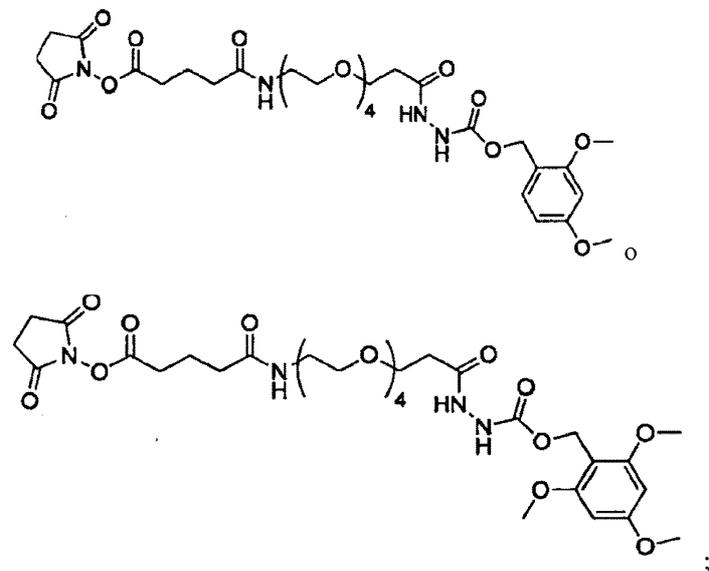
eliminación de los residuos de aminoácidos N-terminales 1-4;

residuo de ácido glutámico en la posición 6 de IGF2 humano de tipo natural sustituido por arginina;

10 residuo de tirosina de IGF 2 humano de tipo natural en la posición 27 sustituido por leucina;

residuo de lisina en la posición 65 de IGF-2 humano sustituido por arginina;

15 el agente reticulador bifuncional comprende grupos de hidrazida protegidos con acetona, dimetilbenciloxycarbonilo, trimetilbenciloxycarbonilo o cualquier combinación de los mismos; o el agente reticulador bifuncional comprende reticulador de hidrazida protegido con N-terc-butoxicarbonilo (tBoc) (NHS-PEG4-tBoc-hidrazida), hidrazida protegida con metoxibenciloxycarbonilo (BOM) (NHS-PEG4-BOM-hidrazida), NHS-PEG4-hidrazida protegida con acetona, NHS-PEG4-hidrazida protegida con dimetilbencilcarbonilo, NHS-PEG4-hidrazida protegida con trimetilbenciloxycarbonilo; o un reticulador de fórmula:



20 o cualquier combinación de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La presente divulgación se comprende mejor cuando se lee conjuntamente con los dibujos adjuntos. A los efectos de ilustrar el objeto, se muestran en los dibujos realizaciones ejemplares del objeto; sin embargo, el objeto divulgado en la presente no se limita a los métodos, dispositivos y sistemas específicos divulgados. Además, los dibujos no se realizan necesariamente a escala. En los dibujos:

La **Figura 1** muestra la modificación del péptido vIGF2 según se monitorea en un sistema de HPLC.

La **Figura 2** muestra la capacidad del conjugado de vIGF2-GAA de unirse al receptor IGF2-CI-MPR en ensayos de

placas de unión.

La **Figura 3** muestra las estructuras químicas de algunos de los reticuladores divulgados.

La **Figure 4. (A)** muestra el tiempo de retención para el péptido de vIGF2 tras la unión del enlazante de hidrazida protegido con tBoc (panel del medio) con respecto al péptido vIGF2 sin modificar de partida (panel superior) y se vio que la eliminación del grupo de protección de tBoc provoca otro cambio (disminución) en la retención en la RP-HPLC C4 (panel inferior).. **(B)** muestra los resultados de rhGAA conjugado con el péptido vIGF2 (por medio de un enlace hidrazona resultante) en ensayos de unión de placa del receptor IGF2/CI-MPR.

La **Figura 5** muestra la evaluación de la captación celular para vIGF2-rhGAA unido a hidrazona mediante internalización de rhGAA sin conjugar exógena (10-500 nM) y vIGF2-rhGAA (2-50 nM) en mioblastos de músculo esquelético de rata L6. **(A)**. Se demostró que vIGF2-rhGAA se internalizó considerablemente mejor que la rhGAA sin conjugar en mioblastos L6 en todas las concentraciones de proteína evaluadas. **(B)** Se analizaron lisados de mioblastos L6 mediante Western blotting utilizando anticuerpos primarios policlonales de GAA antihumanos de conejo.

La **Figura 6** muestra el tiempo de retención en un ensayo de RP-HPLC C4 de péptido vIGF2 purificado químicamente modificado con un exceso molar de 20 veces de la hidrazida protegida con el reticulador bifuncional metilbenciloxi carbonilo (BOM) (NHS-PEG4-BOM-hidrazida) para introducir un grupo funcional hidrazida protegido con BOM en el extremo N del péptido.

Figura 7. (A) muestra el tiempo de retención en un ensayo de RP-HPLC C4 de péptido vIGF2 purificado químicamente modificado con un exceso molar de 20 veces del reticulador bifuncional éster ftalimidooxi-PEG12-NHS para introducir un grupo funcional ftalimidooxi en el extremo N del péptido. **(B)** muestra ensayos de afinidad de vIGF2-rhGAA unido a oxima en ensayos de unión de placa del receptor IGF2/CI-MPR para determinar si el péptido vIGF2 unido mejoró la afinidad de rhGAA para el receptor IGF2/CI-MPR.

La **Figura 8** muestra el tiempo de retención en un ensayo de RP-HPLC C4 de péptido vIGF2 purificado químicamente modificado con un exceso molar de 20 veces del reticulador bifuncional tBoc-aminooxi-PEG₁₂-PFB para introducir un grupo funcional aminooxi protegido con tBoc en el extremo N del péptido.

La **Figura 9** muestra ensayos de unión a placa del receptor IGF2/CI-MPR del péptido vIGF2 modificado por aminooxi directamente conjugado con rhGAA químicamente oxidada (que contiene grupos aldehído químicamente reactivos en carbohidratos) para formar los enlaces de oxima resultantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

El presente objeto puede comprenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada que forma parte de esta divulgación. Debe comprenderse que la presente invención no se limita a los productos, métodos, condiciones o parámetros específicos que se describen y/o muestran en la presente, y que la terminología utilizada en la presente se proporciona a efectos de describir realizaciones particulares a modo de ejemplo únicamente y no pretende limitar la invención reivindicada.

A menos que se defina lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

Tal como se emplearon anteriormente, y a lo largo de la divulgación, se entenderá que los siguientes términos y abreviaturas, a menos que se indique de otra forma, tienen los siguientes significados.

En la presente divulgación, las formas singulares "uno", "un" y "el" incluyen la referencia plural, y la referencia a un valor numérico particular incluye al menos dicho valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta forma, por ejemplo, una referencia a "un compuesto" es una referencia a uno o más de dichos compuestos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc. La expresión "pluralidad", tal como se utiliza en la presente, significa más que uno. Cuando se expresa un rango de valores, otra realización incluye desde el valor particular y/o al otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se comprende que el valor particular forma otra realización. Todos los rangos son inclusivos y combinables.

El abordaje de conjugación química puede mejorarse mediante reticuladores bifuncionales novedosos que pueden utilizarse para la modificación del péptido vIGF2 para introducir un grupo hidrazida protegido. Los grupos protectores lábiles ácidos pueden retirarse eficientemente utilizando soluciones amortiguadoras ácidas leves para una mejor

recuperación del péptido vIGF2 modificado. El péptido vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido puede entonces liofilizarse y almacenarse como un polvo seco para conservar la reactividad química del resto de hidrazida. El péptido vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido puede almacenarse indefinidamente hasta el acoplamiento químico con enzimas lisosomales. Estos reticuladores novedosos, por lo tanto, pueden proporcionar componentes considerablemente más estables y mejor control del proceso de conjugación química para permitir un proceso a mayor escala.

Este abordaje de conjugación química implica modificar el extremo (N) amino y uno o más residuos de lisina en una enzima lisosomal humana recombinante utilizando un primer agente de reticulación para introducir grupos hidrazida protegidos con acetona novedosos en enzimas lisosomales humanas recombinantes. La primera enzima lisosomal humana recombinante modificada por el agente de reticulación puede purificarse entonces para retirar el exceso de reticuladores y los subproductos de reacción. La purificación puede realizarse utilizando soluciones amortiguadoras de pH ácido que preservan la actividad catalítica para enzima lisosomal y desplazan el grupo protector de acetona para exponer los grupos hidrazida químicamente reactivos. Por otro lado, el extremo (N) amino de una región enlazante de corta extensión que precede al péptido vIGF2 puede modificarse utilizando un segundo agente de reticulación para introducir un grupo de aldehído químicamente en el péptido vIGF2. El péptido vIGF2 modificado puede purificarse entonces para retirar el exceso de reticuladores y los subproductos de reacción y liofilizarse luego. En una reacción de acoplamiento final, la enzima lisosomal humana recombinante modificada por hidrazida puede agregarse directamente al péptido vIGF2 modificado por aldehído liofilizado para generar el conjugado de la enzima vIGF2. Aunque este método es efectivo para generar conjugados de vIGF2-enzima, la reacción de conjugación química final preferiblemente se lleva a cabo rápidamente porque los grupos hidrazida introducidos no son estables en soluciones acuosas y, de esta forma, la reactividad química es disminuida en un tiempo relativamente corto (en 1-2 días). Por lo tanto, lograr un proceso a mayor escala puede ser desafiante si la modificación de las enzimas lisosomales con el reticulador bifuncional y la purificación de las enzimas lisosomales modificadas por hidrazida no puede completarse rápidamente (preferiblemente en menos de 1 día).

Sería preferible cambiar el orden de modificación por el que la enzima lisosomal puede modificarse con un agente de reticulación para introducir grupos aldehído y el péptido vIGF2 se modificaría con un agente de reticulación para introducir hidrazida. Sin embargo, una mayoría de reticuladores que contienen hidrazina, tal como succinimidil 6-hidrazinonicotinato acetona (S-Hynic) o reticuladores relacionados provocan aglomeración y/o precipitación del péptido vIGF2 y conducen a una pérdida considerable de péptido. Se proporcionan en la presente reticuladores y métodos apropiados para modificar el péptido vIGF2 con reticuladores bifuncionales para introducir un grupo hidrazida protegido en el péptido de vIGF2. El grupo protector puede retirarse posteriormente mediante incubación en soluciones amortiguadoras ácidas y el péptido vIGF2 modificado por hidrazida puede purificarse mediante cromatografía de fase inversa en HPLC. El péptido vIGF2 modificado por hidrazida purificado puede liofilizarse luego y almacenarse en forma de un polvo seco. Esta estrategia asegura que el grupo hidrazida permanezca químicamente activo para acoplamiento con las enzimas lisosomales. En una reacción separada, una enzima lisosomal recombinante puede modificarse con un agente reticulador para introducir grupos aldehído nuevos. Después de la purificación para retirar el exceso de reticulador y los subproductos de reacción, las enzimas lisosomales modificadas por aldehído pueden almacenarse entonces hasta el acoplamiento con el péptido vIGF2, dado que los grupos aldehído introducidos son químicamente estables en soluciones acuosas. Esta nueva estrategia proporciona "pasos de espera" en el proceso donde los componentes individuales (enzima lisosomal modificada y vIGF2 modificado) pueden almacenarse por tiempo indefinido hasta acoplarse para generar los conjugados de vIGF2-enzima. Este nuevo método genera, por lo tanto, los componentes individuales con estabilidad considerablemente más alta y proporciona un mejor control general del proceso de conjugación que conduce a un proceso a mayor escala.

Los métodos de conjugación química adecuados pueden comprender a) poner en contacto una enzima lisosomal con un primer agente de reticulación para introducir grupos aldehído; b) poner en contacto un péptido de direccionamiento lisosomal con un segundo agente de reticulación para introducir un grupo hidrazida en el residuo terminal N; poner en contacto la enzima lisosomal con grupos aldehído del paso a) con el péptido de direccionamiento lisosomal con un grupo hidrazida en el residuo terminal N del paso b); y formar un conjugado de enzima lisosomal-péptido de direccionamiento lisosomal.

El péptido de direccionamiento lisosomal comprende una variante del factor de crecimiento similar a la insulina humana 2 que comprende uno o más de los siguientes cambios: eliminación de los residuos de aminoácidos N-terminales 1-4 dado que estos residuos no son necesarios para la unión al receptor IGF2/CI-MPR pretendido y también elimina una prolina en la posición 4 y la curva o vuelta asociada en la proteína en el extremo N; residuo de ácido glutámico en la posición 6 del IGF2 humano natural con arginina para reducir o eliminar la unión de péptidos a proteínas de unión a IGF (IGFBP) en suero, residuo de tirosina de IGF 2 humano natural en la posición 27 sustituido por leucina para reducir o eliminar la unión peptídica a insulina y los receptores de IGF-1, y el residuo de lisina en la posición 65 de IGF-2 humano sustituido por arginina para evitar la modificación química del péptido en dicha posición.

En otras realizaciones adicionales, la variante de IGF2 puede incluir o ser una de las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 1 AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE

SEQ ID NO: 2 SRTLGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE

SEQ ID NO: 3 GGGGSRTLGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE

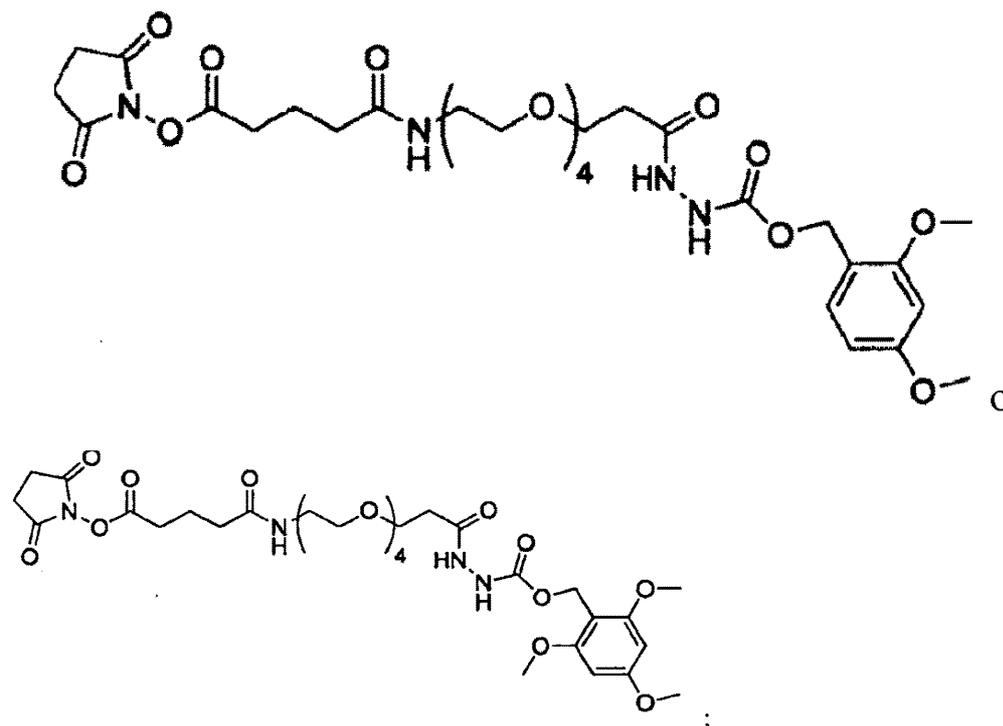
SEQ ID NO: 4

5 GGGGSGGGGSRTLGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE

Enzimas lisosomales adecuadas incluyen α -glucosidasa ácida (rhGAA), α -galactosidasa ácida A (GLA), β -glucuronidasa ácida (GUS), α -iduronidasa A ácida (IduA), iduronidato 2-sulfatasa ácida (I2S), β -hexosaminidasa A (HexA), β -hexosaminidasa B (HexB), α -manosidasa A ácida, β -glucocerebrosidasa (GlcCerasa), lipasa ácida (LPA) o cualquier combinación de las mismas. En otras realizaciones adecuadas, la enzima lisosomal puede ser de mamífero y la enzima lisosomal de mamífero puede ser humana.

Reticuladores bifuncionales adecuados pueden comprender grupos hidrazida protegidos con acetona, dimetilbenciloxicarbonilo, trimetilbenciloxicarbonilo o cualquier combinación de los mismos; o

15 el agente reticulador bifuncional puede comprender reticulador de hidrazida protegido con N-terc-butoxicarbonilo (tBoc) (NHS-PEG4-tBoc-hidrazida), hidrazida protegida con metoxibenciloxicarbonilo (BOM) (NHS-PEG4-BOM-hidrazida), NHS-PEG4-hidrazida protegida con acetona, NHS-PEG4-hidrazida protegida con dimetilbencilcarbonilo, NHS-PEG4-hidrazida protegida con trimetilbenciloxicarbonilo; o un reticulador de fórmula:



o cualquier combinación de los mismos.

20 Péptidos de direccionamiento lisosomal modificados adecuados pueden comprender un grupo hidrazida protegido. En otras realizaciones adecuadas, el péptido de direccionamiento lisosomal modificado puede comprender el péptido vIGF2 modificado. En otras realizaciones adecuadas, el grupo hidrazida es protegido con grupos hidrazida protegidos con acetona, dimetilbenciloxicarbonilo, trimetilbenciloxicarbonilo o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones adecuadas, el péptido de direccionamiento lisosomal modificado está en un polvo. En otras realizaciones
25 adecuadas, el péptido de direccionamiento lisosomal modificado es liofilizado.

Métodos adecuados de realización de un péptido de direccionamiento lisosomal modificado incluyen poner en contacto vIGF2 con un agente de reticulación bifuncional tal como se describió anteriormente para introducir un grupo hidrazida

en el residuo terminal N.. desproteger un vIGF2 modificado por hidrazida en solución para formar un vIGF2 desprotegido modificado por hidrazida; y unir al menos un vIGF2 desprotegido modificado por hidrazida a una enzima lisosomal. La enzima lisosomal puede comprender α -glucosidasa ácida (rhGAA), α -galactosidasa ácida A (GLA), β -glucuronidasa ácida (GUS), α -iduronidasa A ácida (IduA), iduronidato 2-sulfatasa ácida (I2S), β -hexosaminidasa A (HexA), β -hexosaminidasa B (HexB), α -manosidasa A ácida, β -glucocerebrosidasa (GlcCerasa), lipasa ácida (LPA) o cualquier combinación de las mismas.

Conjugados adecuados de enzima lisosomal-péptido de direccionamiento lisosomal pueden comprender una enzima lisosomal reticulada con uno o más vIGF2 por medio de uno o más reticuladores bifuncionales. Reticuladores bifuncionales adecuados pueden comprender reticulador de hidrazida protegido con N-terc-butoxicarbonilo (tBoc) (NHS-PEG4-tBoc-hidrazida), hidrazida protegida con metoxibenciloxycarbonilo (BOM) (NHS-PEG4-BOM-hidrazida), NHS-PEG4-hidrazida protegida con acetona, NHS-PEG4-hidrazida protegida con dimetilbencilcarbonilo, NHS-PEG4-hidrazida protegida con trimetilbenciloxycarbonilo; o un reticulador de fórmula:

CORRECTOR: please insert formulae from page 7/L1-20 or \rightarrow o

o cualquier combinación de las mismas. La enzima lisosomal adecuadamente incluye α -glucosidasa ácida (rhGAA), α -galactosidasa ácida A (GLA), β -glucuronidasa ácida (GUS), α -iduronidasa A ácida (IduA), iduronidato 2-sulfatasa ácida (I2S), β -hexosaminidasa A (HexA), β -hexosaminidasa B (HexB), α -manosidasa A ácida, β -glucocerebrosidasa (GlcCerasa), lipasa ácida (LPA) o cualquier combinación de las mismas.

Asimismo, puede implementarse otro paso de liofilización del péptido de direccionamiento lisosomal modificado para formar un polvo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, aunque son realizaciones individuales ilustrativas, no limitan el alcance de la invención descrita y el lector no debería interpretarlos de ese modo.

EJEMPLO 1

Se utilizó un nuevo abordaje de conjugación química para el acoplamiento químico del péptido vIGF2 en enzimas lisosomales para aumentar su unión con el receptor IGF2/CI-MPR. Este abordaje es diferente a lo que se había descrito anteriormente, de forma tal que las enzimas lisosomales se modifican con un agente de reticulación para introducir grupos aldehído mientras que el péptido vIGF2 se modifica con un segundo agente de reticulación para introducir un grupo hidrazida en el residuo terminal N. Específicamente, la α -glucosidasa ácida humana natural recombinante (rhGAA) se concentró hasta 7.5 mg/ml por medio de un dispositivo concentrador equipado con una membrana de corte de peso molecular de 50 kDa y luego se intercambió mediante solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM (pH 6.5)/NaCl 100 mM/0.05% de polisorbato-80 mediante diálisis a 4°C durante la noche. La rhGAA se modificó luego químicamente con un exceso molar de 20 veces de reticulador de N-succinimidil-4-formilbenzamida (S-4FB; Solulink) durante 2 hrs a temperatura ambiente para introducir grupos novedosos de benzaldehído. La rhGAA modificada por benzaldehído se purifica luego en NaOAc 50 mM (pH 4.8)/solución amortiguadora de NaCl 50 mM para eliminar el exceso de reticulador y los productos derivados de reacción y se almacena a 4°C hasta el acoplamiento químico con el péptido vIGF2.

En una reacción separada, el péptido vIGF2 purificado se reconstituyó a 0.6 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM (pH 7.5)/NaCl 50 mM/0.05% de polisorbato-80 y se modificó con un exceso molar de 20 a 40 veces de reticulador de hidrazida protegido con N-terc-butoxicarbonilo (tBoc) (NHS-PEG4-tBoc-hidrazida; Quanta Biodesign). La modificación del péptido vIGF2 se monitoreó utilizando una columna Jupiter de 4.6 x 250 mm, 5 μ m, 300 Å C4 (Phenomenex, Torrance, CA) en un sistema de HPLC de Agilent Technologies (Palo Alto, CA) (C4 RP-HPLC) tal como se muestra en la **Figura 1**. Las fases móviles consistían en Solución amortiguadora A (0.1% de TFA en agua) y Solución amortiguadora B [0.1% de TFA en acetonitrilo (MeCN)]. Este método analítico, designado como HPLC de fase inversa C4 (C4 RP-HPLC), se utilizó para caracterizar las muestras del péptido IGF2 mediante inyección de 5–100 μ L de muestras en la columna C4 preequilibrada con 74% de Solución amortiguadora A, 26% de Solución amortiguadora B a 2 mL/min. Dos minutos después de la inyección de la muestra, se desarrolló un gradiente lineal de 26% a 33% de Solución amortiguadora B en 13 minutos. En estas condiciones, el péptido vIGF2 sin modificar se eluye a aproximadamente 11.5 minutos. Puesto que el reticulador se une químicamente a vIGF2 durante la reacción de modificación, el péptido IGF2 modificado tiene un perfil cromatográfico distinto y aparece como un pico de elución tardía nuevo en C4 RP-HPLC con un tiempo de retención aparente de ~13.5 min. Cuando el péptido vIGF2 fue >95% modificado con reticulador, la reacción se detuvo al agregar TFA (15% de concentración final) y se incubó por hasta 4 hrs. Este paso de incubación se utilizó para retirar el grupo de protección de tBoc tal como se demuestra mediante el cambio considerable en el tiempo de retención de vIGF2 en C4 RP-HPLC. En estas condiciones experimentales, se retiró aproximadamente 50% del tBoc. Ocurrió una pérdida

considerable del péptido vIGF2 modificado utilizando incubaciones más prolongadas o concentraciones más altas de TFA. El péptido vIGF2 modificado por hidrazida se purificó luego por medio de C4 RP-HPLC preparativa, se liofilizó y se almacenó como polvo seco y a 4°C hasta el acoplamiento químico con la rhGAA.

5 La rhGAA modificada por benzaldehído se conjugó químicamente con el péptido vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido en una reacción final al agregar la enzima lisosomal directamente al péptido liofilizado a un exceso molar de péptido de 4 veces. La anilina, un catalizador químico de esta reacción, se agregó a una concentración final de 10 mM y la reacción se incubó durante la noche a temperatura ambiente con agitación suave. El conjugado de vIGF2-rhGAA se purificó el día siguiente utilizando cromatografía de exclusión por tamaño para retirar el exceso del péptido vIGF2 utilizando fosfato de sodio 50 mM (pH 6.2)/NaCl 100 mM/0.05% (v/v) de solución amortiguadora de polisorbato-10 80.

Para determinar si el péptido vIGF2 modificado retuvo la estructura correcta de proteínas después de retirar el grupo de protección de tBoc, se evaluó la capacidad del conjugado de vIGF2-GAA de unirse al receptor IGF2/CI-MPR en ensayos de unión de placa tal como se muestra en la **Figura 2**. Brevemente, la rhGAA sin conjugar y vIGF2-rhGAA se diluyeron en serie con Solución Amortiguadora de Unión [HEPES 40 mM (pH 6.7), NaCl 150 mM, EDTA 10 mM y 0.02% (v/v) Tween-20] para obtener concentraciones de GAA finales en el rango de 0.01-10 µg/ml y se incubaron en placas recubiertas con receptor IGF2/CI-MPR a 37°C durante 30 min. La placa de receptor se lavó 3X con Solución Amortiguadora de Unión para retirar la enzima no unida y la cantidad de enzima GAA unida se midió utilizando el sustrato fluorogénico de 4-metilumbeliferil- α -glucosa [4-MU- α -Glc; 1 mM de concentración de sustrato final en 50 µl de NaOAc 0.1M (pH 4.8)]. Cuarenta y cinco µL de las muestras de reacción se transfirieron luego a nuevas placas de ensayo de 96 pocillos de fondo claro negro y 125 µL de NaOH 0.5 M se agregaron para detener la reacción enzimática y para elevar el pH. La fluorescencia de 4-MU liberada de las reacciones enzimáticas individuales se cuantificaron luego de las reacciones enzimáticas individuales en una lectora de placas de fluorescencia (utilizando 370 nm de excitación y 460 longitudes de onda de emisión, respectivamente). Tal como se muestra en la **Figura 2**, vIGF2-GAA se unió el receptor IGF2/CI-MPR considerablemente mejor que el material de partida de rhGAA en todas las concentraciones evaluadas. La unión de vIGF2-GAA parecía estar saturada en o por encima de 25 nM como se esperaba. Por lo tanto, estos resultados muestran que el péptido vIGF2 fue capaz de mantener la conformación correcta de proteínas después de la eliminación del grupo de desprotección de tBoc que permitió alta unión por afinidad al receptor IGF2/CI-MPR.

EJEMPLO 2

30 Se demostró que el reticulador de NHS-PEG4-tBoc-hidrazida modifica de manera eficiente el péptido vIGF2 para introducir un grupo hidrazida novedoso mientras que se mantiene una buena solubilidad para el péptido. Sin embargo, el grupo de protección de tBoc fue difícil de retirar utilizando condiciones ácidas leves y utilizó concentraciones más altas de TFA (15%) e incubaciones de 4 hr para la desprotección. En estas condiciones difíciles, aun pudimos recuperar solamente ~50% del péptido vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido. El abordaje mejoraría también si los reticuladores pueden diseñarse con grupos de protección lábiles para la eliminación eficiente y mejor recuperación del péptido modificado. 35

Los reticuladores bifuncionales novedosos se han desarrollado para conexión eficiente al péptido vIGF2 y para introducir grupos protegidos de hidrazida mientras se mantiene una buena solubilidad para el péptido. Estos nuevos reticuladores contienen grupos hidrazida protegidos con acetona, dimetilbenciloxicarbonilo o trimetilbenciloxicarbonilo tal como se muestra en la **Figura 3**. Estos grupos de protección son mucho más lábiles que tBoc y utilizarían condiciones ácidas leves (por ejemplo, <5% de TFA) para eliminación eficiente y alta recuperación del péptido modificado. Asimismo, estos nuevos reticuladores deberían permitir el almacenamiento a largo plazo del péptido vIGF2 modificado desprotegido después de la purificación y liofilización. Estos nuevos reticuladores permitirán, por lo tanto, un aumento y mejor control del proceso de conjugación química. 40

EJEMPLO 3

45 Se concentró α -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) a 8-10 mg/ml a pequeña escala (es decir, <100 mg) utilizando dispositivos concentradores centrífugos (por ejemplo, Amicon Ultra con 50 kDa de membrana de corte de peso molecular nominal (MWCO); Millipore) y luego se intercambió mediante solución amortiguadora a *Solución Amortiguadora de Modificación* [fosfato de sodio 50 mM (pH 6.5)/NaCl 100 mM/ glucosa 100mM/2% de manitol/0.05% de polisorbato-80] por medio de diálisis durante la noche a 4°C. Para preparaciones a mayor escala (por ejemplo, >200mg de rhGAA), la concentración de proteínas e intercambio de solución amortiguadora pueden lograrse mediante diafiltración/concentración utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) con una membrana de 50 kDa de MWCO. La concentración proteica de rhGAA se determina mediante espectroscopía de absorbancia UV a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar (ϵ) de 166,117 M⁻¹cm⁻¹. La concentración proteica de rhGAA se ajustó luego a 7.5 mg/ml mediante dilución con *Solución Amortiguadora de Modificación* y se incubó con exceso molar de 25 veces del reticulador bifuncional succinimidil 4-formilbenzoato (SFB) a aproximadamente 20°C durante 4 horas para introducir 55

- grupos de benzaldehído novedosos (aldehído aromático) en rhGAA. La rhGAA modificada por benzaldehído se dializó contra NaOAc 50 mM (pH 4.8)/NaCl 100 mM/0.05% de polisorbato-80 a 4°C con múltiples cambios de solución amortiguadora para eliminar el exceso de reticulador y los productos derivados de reacción. La rhGAA químicamente modificada es estable en esta solución amortiguadora y puede almacenarse por tiempo indefinido hasta la conjugación química con el péptido vIGF2. Es importante señalar que los grupos de benzaldehído introducidos en rhGAA permanecen químicamente reactivos para la conjugación con péptido vIGF2 modificado por hidrazida o aminooxi. También hemos determinado que la rhGAA modificada por benzaldehído puede almacenarse en fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/0.05% de polisorbato-80 sin efectos adversos en la estabilidad de GAA o eficiencia de acoplamiento.
- Para determinar el alcance de la modificación química y para identificar los residuos de aminoácidos específicos que se modifican, se generaron mapas de péptidos de rhGAA modificada por benzaldehído y se compararon directamente con la muestra de rhGAA de partida sin modificar mediante análisis de cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC-MS). En resumen, se generó un mapa de péptidos de referencia para la muestra de rhGAA sin modificar de partida mediante digestión de la rhGAA en los fragmentos peptídicos utilizando una mezcla de proteasas específicas seguido por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa C18 y análisis de fragmentos peptídicos individuales por espectroscopía de masas. Cuatro preparaciones diferentes de rhGAA modificada por benzaldehído se digirieron y procesaron de la misma manera y se compararon con el mapa de péptidos de referencia para rhGAA de partida sin modificar. Nuestros resultados de LC-MS indican que un promedio de aproximadamente 2 grupos de benzaldehído novedosos se introduce en rhGAA utilizando este procedimiento de modificación química. Asimismo, los resultados de LC-MS muestran que la modificación química de rhGAA no se distribuye al azar en los diferentes residuos de lisina en rhGAA. En lugar de ello, la modificación química de rhGAA parece ser mucho más ordenada y reducida a unos pocos residuos de lisina tal como se muestra en la **Tabla 1**. Los datos de LC-MS muestran que ~90% de Lys⁹⁰² se modifica con el resto de benzaldehído mientras que aproximadamente 50% de Lys⁷³² y Lys⁸³⁸ se modifican. Una fracción considerablemente más pequeña de Lys¹¹³ (8%) y Lys¹⁶¹ (17%) se modifica en estas condiciones experimentales. El error experimental para este análisis de LC-MS se estimó que era ±10%.

Tabla 1. Identificación de residuos de aminoácidos químicamente modificados en rhGAA

Lote de GAA	Residuos modificados					Residuos modificados estimados
	Lys ¹¹³	Lys ¹⁶¹	Lys ⁷³²	Lys ⁸⁴⁸	Lys ⁹⁰²	
A (2/01/13)	8%	17%	53%	40%	90%	2.11
B (4/04/13)	9%	16%	52%	45%	89%	2.14
C (4/09/13)	8%	17%	53%	40%	90%	2.11
D (4/12/13)	6%	17%	53%	43%	89%	2.13
PRO	8 ± 1.3%	17 ± 0.6%	53% ± 0.6%	42% ± 2.4%	89% ± 0.5%	2.12

- Los datos de LC-MS fueron informativos y tienen implicaciones muy importantes para el abordaje de conjugación química descrito. Hay 15 residuos de lisina diferentes dentro de la rhGAA; cada uno teóricamente tiene el mismo potencial de modificación química. Sin embargo, nuestros datos empíricos son contrarios a esta hipótesis y muestran que el proceso de modificación química parece mucho más ordenado que lo previsto en donde solo pocos residuos de lisina selectos se modificaron consistentemente con grupos de benzaldehído para 4 lotes diferentes de rhGAA modificada por SFB utilizando el método descrito en la presente. Además, los datos de LC-MS indican que hay una modificación preferencial de los residuos de lisina de forma tal que Lys⁹⁰² siempre se modifica con reticulador, mientras que aproximadamente la mitad de los residuos de Lys⁷³² y Lys⁸³⁸ se modifican con reticulador. Solo una pequeña fracción de Lys¹¹³ y Lys¹⁶¹ se modificó con grupo benzaldehído. Estos datos sugieren que la modificación preferencial observada dependió de la accesibilidad y competencia química de residuos de lisina individuales para la modificación química con reticulador. Por ejemplo, los residuos de lisina pueden protonarse y vincularse con puentes de sal en formación (es decir., interacciones electrostáticas) con residuos de ácido aspártico de carga negativa o ácido glutámico y no están disponibles para la modificación química. Los datos de LC-MS sugieren que Lys⁹⁰² es el más accesible y químicamente competente para la modificación y probablemente el primer residuo modificado. Asimismo, Lys⁷³² y Lys⁸³⁸ son menos accesibles que Lys⁹⁰² para la modificación química pero Lys⁷³² y Lys⁸³⁸ tienen accesibilidad similar entre sí, dado que una fracción aproximadamente equivalente de cada una es modificada. Estos datos sugieren que ya sea Lys⁷³² o Lys⁸³⁸ es el segundo residuo de lisina modificado. Lys¹¹³ y Lys¹⁶¹ son accesibles solo parcialmente para la

modificación química, de forma que solo una pequeña fracción de rhGAA contiene benzaldehído en estos residuos de lisina. No se observó modificación química del extremo amino (N) para rhGAA pero se sabe que esta enzima se modifica naturalmente (cicla) en células para formar piroglutamato que no es químicamente competente para la modificación con reticuladores bifuncionales.

- 5 Estos datos colectivos indican que el procedimiento de modificación química descrito puede utilizarse para proporcionar reproduciblemente rhGAA con un promedio de 2.12 grupos de benzaldehído introducidos para acoplamiento con el péptido vIGF2. Dado que el número de péptido vIGF2 conjugado con rhGAA depende del número de grupos benzaldehído introducidos, estos resultados indican que un promedio de 2 péptidos vIGF2 pueden conjugarse con rhGAA.
- 10 Después de la modificación química con SFB, la rhGAA modificada con benzaldehído es muy estable en soluciones amortiguadoras levemente ácidas tales como fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/0.05% de polisorbato-80 o NaOAc 50 mM (pH 4.8)/NaCl 100 mM/0.05% de polisorbato-80 y puede almacenarse por mucho tiempo antes de la conjugación química, lo cual es altamente deseable para realizar este proceso de conjugación a mayor escala.

EJEMPLO 4

- 15 La rhGAA modificada por benzaldehído puede utilizarse para la conjugación química con el péptido vIGF2 por medio de grupos químicos específicos, tales como hidrazida para formar un enlace hidrazona de la siguiente forma. El péptido vIGF2 purificado liofilizado se reconstituyó a 0.6 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM (pH 7.5)/NaCl 50 mM/0.05% de polisorbato-80 y se incubó con un exceso molar de 20 veces de reticulador de hidrazida protegido con N-terc-
- 20 hidroxycarbonilo (tBoc) (NHS-PEG4-tBoc-hidrazida; Quanta Biodesign) a temperatura ambiente para introducir un grupo hidrazida protegido con tBoc en el extremo N. La reacción se monitoreó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa C4 (C4 RP-HPLC) para evaluar el avance y alcance de la modificación de vIGF2. El método de C4 RP-HPLC utilizó una columna de 4.6 x 250 mm 5 µm, 300 Å C4 Jupiter (Phenomenex, Torrance, CA) en un sistema de HPLC de Agilent Technologies (Palo Alto, CA) que consistía en una bomba cuaternaria de 1100 series, muestreador automatizado, compartimiento de columna con termostato y detector de arreglo de diodos (DAD) con
- 25 Software Agilent ChemStation (Rev. B.04.03). Las fases móviles consistían en Solución amortiguadora A: 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y Solución amortiguadora B: 0.1% de TFA en acetonitrilo (MeCN). Las muestras de péptidos se cargaron en una columna C4 preequilibrada con 26% de acetonitrilo (MeCN/0.1% de TFA). Después de 2 minutos, la columna se desarrolló utilizando un gradiente lineal de 26-33% de MeCN/0.1% de TFA en 13 minutos. Tal como se muestra en la **Figura 4A**, un cambio considerable (aumento) en el tiempo de retención se observa tras la
- 30 modificación química del péptido vIGF2 para unirse a PEG4-tBoc-hidrazida (panel del medio). Después de completarse la modificación química del péptido vIGF2 (normalmente en 2 hrs), se purificó un péptido vIGF2 modificado por tBoc-hidrazida mediante C4 RP-HPLC preparativa para eliminar el exceso de reticulador y los productos derivados de reacción y se liofilizó para retirar los disolventes volátiles. El péptido secado se reconstituyó luego en 2% de TFA (en dH₂O) y se incubó a temperatura ambiente por hasta 72 hrs para retirar el grupo de protección de tBoc y exponer el
- 35 grupo hidrazida para la conjugación posterior con enzimas lisosomales. El avance de la desprotección de tBoc también se monitoreó mediante C4 RP-HPLC y normalmente se muestra que reduce el tiempo de retención del péptido tras la eliminación de tBoc hasta casi el del péptido vIGF2 no modificado de partida (**Figura 4A**, panel inferior). La desprotección completa del grupo tBoc normalmente requirió aproximadamente 60 hrs en estas condiciones experimentales. El vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido con tBoc se purificó luego mediante C4 HPLC
- 40 preparativa, se liofilizó y se almacenó en seco hasta conjugación química con rhGAA modificada por benzaldehído. El retiro del grupo de protección de tBoc también ha sido evaluado utilizando concentraciones de TFA más altas (por ejemplo, 4% de TFA) y otros ácidos y disolventes orgánicos pero dichas condiciones condujeron a una recuperación mucho más baja de péptido vIGF2 modificado por hidrazida. El péptido vIGF2 de hidrazida desprotegido se conjugó
- 45 químicamente con rhGAA modificada por benzaldehído (utilizando un exceso molar de 4 veces de péptido vIGF2 a rhGAA) por medio de un enlace hidrazona resultante de la siguiente forma. La concentración proteica de rhGAA modificada por benzaldehído se ajustó normalmente a 4-5 mg/ml con fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/0.05% de solución amortiguadora de polisorbato-80 y la enzima se agregó directamente al péptido vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido liofilizado (a una relación molar de 1 mol de rhGAA: 4 moles de péptido vIGF2) y se incubó a
- 50 aproximadamente 20°C durante aproximadamente 16 horas. También puede agregarse anilina (5-10 mM) para aumentar la tasa de acoplamiento pero hemos encontrado que no era absolutamente necesario para acoplamiento en estas condiciones experimentales. La rhGAA conjugada con péptido vIGF2 se purificó luego por cromatografía de exclusión por tamaño en fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/2% de manitol/0.05% de solución amortiguadora de polisorbato-80 para retirar el exceso del péptido vIGF2. Fracciones pico de vIGF2-rhGAA se agruparon y concentraron utilizando Amicon Ultra con una membrana de acetato de celulosa de corte de peso molecular nominal de 30 kDa.
- 55 vIGF2-rhGAA se caracterizó mediante ensayos de unión a placa de receptor para determinar si el péptido vIGF2 enlazado a hidrazona aumentaría la unión de rhGAA al receptor IGF2/CI-MPR pretendido. Tal como se muestra en la **Figura 4B**, vIGF2-rhGAA se unió al receptor IGF2/CI-MPR considerablemente mejor que la rhGAA sin conjugar y se correlacionó con una captación celular considerablemente mejor de la enzima lisosomal exógena en un modelo

- celular de músculo esquelético (**Figura 5A**). Estos resultados muestran la importancia funcional de la unión del receptor mejorada para captación celular mejorada del fármaco terapéutico exógeno en células de músculo objetivo. El análisis por Western blot de lisados celulares de músculo muestran que el vIGF2-rhGAA internalizado se administró a los lisosomas donde se retiró el péptido vIGF2 y rhGAA se procesó normalmente como se observó para la enzima rhGAA sin conjugar (**Figura 5B**). Estos resultados eran esperados, dado que se había reportado anteriormente que el péptido IGF2 se degradaba naturalmente mediante proteasas lisosomales residentes. Es importante señalar que los datos de Western blot indican que el péptido vIGF2 químicamente acoplado se retiró y no impidió el procesamiento de GAA en los lisosomas. (El procesamiento de GAA es necesario para unión de alta afinidad y cinética de enzimas GAA óptima para hidrolizar el sustrato de glicógeno natural).
- 5 Por lo tanto, estos datos colectivos confirman que esta conjugación química alternativa puede utilizarse para generar conjugados de enzimas vIGF2-rhGAA que tienen una unión considerablemente mejor con el receptor IGF2-CI-MPR pretendido para captación celular y administración del fármaco terapéutico a lisosomas de células objetivo mejoradas. Este procedimiento de modificación/conjugación química alternativa genera componentes intermedios estables que pueden almacenarse por tiempo indefinido antes de la conjugación y purificación química final. Diferentes lotes de intermediarios estables también pueden agruparse para formar lotes más grandes para la reacción de conjugación final. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente representan importantes avances para permitir realizar el proceso de conjugación química a mayor escala para generar TRE mejoradas.

EJEMPLO 5

- Además de utilizar reticuladores de hidrazida protegidos con tBoc para la modificación del péptido vIGF2, también pueden utilizarse otros reticuladores con diferentes grupos de protección. Hemos sintetizado químicamente un reticulador bifuncional que contiene una hidrazida protegida con metilbenciloxi carbonilo (BOM) (NHS-PEG4-BOM-hidrazida) para introducir un grupo hidrazida novedoso al extremo N del péptido vIGF2. Después de retirar el grupo de protección de BOM, el grupo hidrazida químicamente reactivo se expone para la conjugación posterior a enzimas lisosomales modificadas por benzaldehído por medio de un enlace hidrazona resultante de la siguiente forma. El péptido vIGF2 purificado liofilizado se reconstituyó a 0.6 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM (pH 7.5)/NaCl 50 mM/0.05% de polisorbato-80 y se incubó con un exceso molar de 20 veces de NHS-PEG4-BOM-hidrazida a temperatura ambiente para introducir un grupo hidrazida protegido con BOM novedoso en el extremo N. La reacción se monitoreó mediante C4 RP-HPLC para evaluar el avance y alcance de la modificación de vIGF2. Un cambio considerable (aumento) en el tiempo de retención se observa tras la modificación química del péptido vIGF2 para unirse a PEG4-BOM-hidrazida (**Figura 6**, panel del medio). Después de completarse la modificación química del péptido vIGF2 (normalmente en 2 hrs), se purificó un péptido vIGF2 modificado por BOM-hidrazida mediante C4 RP-HPLC preparativa para eliminar el exceso de reticulador y los productos derivados de reacción y se liofilizó para retirar los disolventes volátiles. El péptido secado se reconstituyó luego en 2% de TFA (en dH₂O) y se incubó a temperatura ambiente por hasta 72 hrs para retirar el grupo de protección de BOM y exponer el grupo hidrazida para la conjugación posterior con enzimas lisosomales. El avance de la desprotección de BOM también se monitoreó mediante C4 RP-HPLC y normalmente se muestra que reduce el tiempo de retención del péptido tras la eliminación de BOM hasta cerca de aquel del péptido vIGF2 no modificado de partida (**Figura 6**, panel inferior). La desprotección completa del grupo BOM normalmente requirió aproximadamente 60 hrs en estas condiciones experimentales. El vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido con BOM se purificó luego mediante C4 RP- HPLC preparativa, se liofilizó y se almacenó en seco hasta conjugación química con rhGAA modificada por benzaldehído.

- El péptido vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido puede conjugarse luego químicamente con rhGAA modificada por benzaldehído tal como se describió anteriormente en el **Ejemplo 2** para péptido hidrazida-vIGF2 desprotegido con tBoc. Estos datos muestran que el péptido vIGF2 puede modificarse químicamente con reticuladores bifuncionales que contienen varios grupos hidrazida protegidos y después de la eliminación del grupo protector se generó la misma hidrazida químicamente reactiva para la conjugación del péptido vIGF2 con enzimas lisosomales modificadas por benzaldehído.

EJEMPLO 6

- La rhGAA modificada por benzaldehído también se puede utilizar para la conjugación química con péptido vIGF2 modificado por aminooxi por medio de un enlace oxima muy estable de la siguiente forma. El péptido vIGF2 purificado liofilizado se reconstituyó a 0.6 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM (pH 7.5)/NaCl 50 mM/0.05% de polisorbato-80 y se incubó con un exceso molar de 20 veces de éster ftalimidooxi-PEG12-NHS (Quanta Biodesign) a temperatura ambiente para introducir un grupo de ftalimidooxi novedoso en el extremo N. Después de completarse la modificación química del péptido vIGF2 (normalmente en 2 hrs), el péptido vIGF2 modificado por ftalimidooxi se incubó luego con hidrazina 0.5M a temperatura ambiente durante 30-60 min para convertir el grupo de ftalimidooxi intermedio al grupo aminooxi deseado. Se utilizó C4 RP-HPLC para monitorear la reacción de modificación química y la conversión del grupo ftalimidooxi al grupo aminooxi. Tal como se muestra en la Figura 7A, el péptido vIGF2 modificado por aminooxi tuvo un tiempo de

retención levemente más prolongado en C4 RP-HPLC en comparación con el péptido vIGF2 sin modificar. El péptido vIGF2 modificado por aminooxi se acidifica con TFA y luego se purifica mediante C4 RP-HPLC preparativa para retirar el exceso de reticulador y los productos derivados de reacción y se liofilizó para retirar los disolventes volátiles. Se utilizó el péptido vIGF2 de hidrazida modificado por aminooxi secado directamente para la conjugación química con rhGAA modificada por benzaldehído mediante un enlace de oxima resultante. En resumen, la concentración proteica de rhGAA modificada por benzaldehído se ajustó normalmente a 4-5 mg/ml con fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/0.05% de solución amortiguadora de polisorbato-80 y la enzima se agregó directamente al péptido vIGF2 modificado por aminooxi seco (a una relación molar de 1 mol de rhGAA: 4 moles de péptido vIGF2) y se incubó a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 16 horas. La rhGAA conjugada con péptido vIGF2 se purificó luego por cromatografía de exclusión por tamaño en fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/2% de manitol/0.05% de solución amortiguadora de polisorbato-80 para retirar el exceso del péptido vIGF2 tal como se describió anteriormente.

vIGF2-rhGAA se caracterizó mediante ensayos de unión a placa de receptor para determinar si el péptido vIGF2 enlazado a oxima aumentaría la unión de rhGAA al receptor IGF2/CI-MPR pretendido. Tal como se muestra en la **Figura 7B**, vIGF2-rhGAA se unió al receptor IGF2/CI-MPR considerablemente mejor que la rhGAA sin conjuguar. Además, el enlace de oxima es muy estable y asegura que el péptido vIGF2 permanezca conjugado con rhGAA y solo se retira tras su degradación en lisosomas después de la administración del fármaco terapéutico.

EJEMPLO 7

El péptido vIGF2 también puede conjugarse químicamente con enzimas lisosomales por medio de un enlace de oxima utilizando reticulador bifuncional de aminooxi protegido con tBoc. Este abordaje proporciona el péptido vIGF2 modificado por aminooxi para la conjugación química con enzimas lisosomales modificadas por benzaldehído sin que sea necesaria conversión química utilizando hidrazida potencialmente peligrosa. En resumen, el péptido vIGF2 purificado liofilizado se reconstituyó a 0.6 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM (pH 7.5)/NaCl 50 mM/0.05% de polisorbato-80 y se incubó con un exceso molar de 20 veces de reticulador de aminooxi protegido con tBoc bifuncional (con grupo NHS- o pentafluorobenceno) a temperatura ambiente para introducir un grupo de aminooxi protegido con tBoc novedoso en el extremo N y se monitoreó mediante C4 RP-HPLC. Tal como se muestra en la **Figura 8** (panel del medio), un cambio considerable (aumento) en el tiempo de retención se observa tras la modificación química del péptido vIGF2 para unirse al reticulador de t-Boc-aminooxi PEGilado (panel del medio). Después de completarse la modificación química del péptido vIGF2 (normalmente en 2 hrs), se purificó un péptido vIGF2 modificado por tBoc-aminooxi mediante C4 RP-HPLC preparativa para eliminar el exceso de reticulador y los productos derivados de reacción y se liofilizó para retirar los disolventes volátiles. El péptido secado se reconstituyó luego en 2% de TFA (en dH₂O) y se incubó a temperatura ambiente por hasta 72 hrs para retirar el grupo de protección de tBoc y exponer el grupo de aminooxi para la conjugación posterior con enzimas lisosomales. El avance de la desprotección de tBoc también se monitoreó mediante C4 RP-HPLC y normalmente se muestra que reduce el tiempo de retención del péptido tras la eliminación de tBoc hasta casi el del péptido vIGF2 no modificado de partida (**Figura 8**, panel inferior). La desprotección completa del grupo tBoc normalmente requirió aproximadamente 50 hrs en estas condiciones experimentales. El vIGF2 modificado por aminooxi desprotegido con tBoc se purificó luego mediante C4 RP- HPLC preparativa, se liofilizó y se almacenó en seco hasta conjugación química con enzimas modificadas por benzaldehído.

EJEMPLO 8

Un método alternativo para generar vIGF2-rhGAA unido a oxima utilizando un reticulador simple puede lograrse mediante acoplamiento del péptido vIGF2 modificado por aminooxi a rhGAA químicamente oxidada de la siguiente forma. La rhGAA se intercambió mediante solución amortiguadora a NaOAc 0.1M (pH 5.2) mediante diálisis o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y se ajustó la concentración proteica a 5 mg/ml con la misma solución amortiguadora. La rhGAA se incubó luego con meta-periodato de sodio 2mM a 4°C durante 30 min para oxidar los carbohidratos (principalmente ácidos siálicos terminales y galactosa) en N-glicanos de rhGAA para generar grupos aldehído químicamente reactivos para la conjugación química con péptido vIGF2 modificado por aminooxi. La rhGAA químicamente oxidada se dializó contra NaOAc 0.1M (pH 5.2) o se sometió a SEC para retirar el exceso de meta-periodato de sodio. La rhGAA oxidada (almacenada a aproximadamente 4 mg/ml) se agregó directamente al péptido vIGF2 modificado por aminooxi a una relación molar de 1 mol de rhGAA:4 moles de péptido vIGF2 y se incubó a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 16 horas para formar el enlace de oxima resultante. La rhGAA conjugada con péptido vIGF2 se purificó luego por SEC en fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0)/NaCl 100 mM/2% de manitol/0.05% de solución amortiguadora de polisorbato-80 para retirar el exceso del péptido vIGF2 tal como se describió anteriormente.

vIGF2-rhGAA se caracterizó mediante ensayos de unión a placa de receptor para determinar si el péptido vIGF2 enlazado a oxima aumentaría la unión de rhGAA al receptor IGF2/CI-MPR pretendido. Tal como se muestra en la **Figura 9**, vIGF2-rhGAA se unió al receptor IGF2/CI-MPR considerablemente mejor que la rhGAA sin conjuguar. La unión del receptor mejorada dependió de la presencia de vIGF2 dado que la rhGAA oxidada (que carece del péptido vIGF2)

5 demostró tener una unión similar a la enzima rhGAA sin conjugar de partida. Los datos de unión del receptor también sugieren que más péptidos vIGF2 se conjugaron con rhGAA químicamente oxidada que la rhGAA modificada por SFB (benzaldehído). Dado que hay más carbohidratos terminales en N-glicanos que son completamente accesibles y pueden oxidarse químicamente para formar aldehídos, hay un potencial alto de conjugación para más péptidos vIGF2 en comparación con rhGAA modificada por SFB (que introduce un promedio de 2 grupos benzaldehído para acoplar el péptido vIGF2 utilizando el procedimiento descrito en la presente). Estos resultados confirman, por lo tanto, que el péptido vIGF2 modificado por aminooxi puede utilizarse para el acoplamiento con enzimas lisosomales que contienen aldehído para una unión mejorada con el receptor IGF2/CI-MPR pretendido para una mejor administración del fármaco terapéutico.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método de realización de un péptido de direccionamiento lisosomal modificado que comprende:

a. poner en contacto el factor de crecimiento similar a la insulina 2 variante (vIGF2) con un agente reticulador bifuncional para introducir un grupo de hidrazida protegido en el residuo N-terminal;

5 b. desproteger el vIGF2 modificado por hidrazida en solución para formar un vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido;

c. poner en contacto una enzima lisosomal con un primer agente reticulante para introducir grupos aldehído;

d. enlazar al menos un vIGF2 modificado por hidrazida desprotegido con la enzima lisosomal;

en donde:

10 el vIGF2 comprende uno o más de los siguientes cambios en comparación con la secuencia de IGF2 humana de tipo natural:

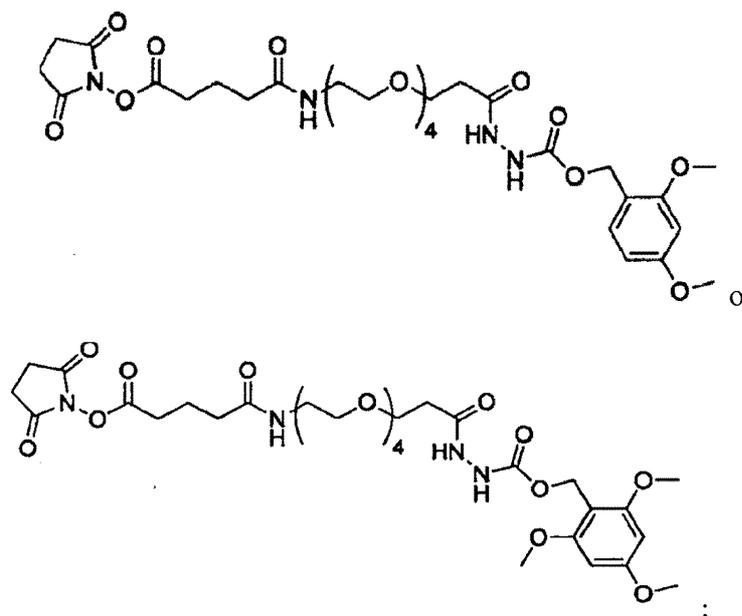
eliminación de los residuos de aminoácidos N-terminales 1-4;

residuo de ácido glutámico en la posición 6 de IGF2 humano de tipo natural sustituido por arginina;

residuo de tirosina de IGF 2 humano de tipo natural en la posición 27 sustituido por leucina;

15 residuo de lisina en la posición 65 de IGF-2 humano sustituido por arginina;

el agente reticulador bifuncional comprende grupos de hidrazida protegidos con acetona, dimetilbenciloxycarbonilo, trimetilbenciloxycarbonilo o cualquier combinación de los mismos; o el agente reticulador bifuncional comprende reticulador de hidrazida protegido con N-terc-butoxicarbonilo (tBoc) (NHS-PEG4-tBoc-hidrazida), hidrazida protegida con metoxibenciloxycarbonilo (BOM) (NHS-PEG4-BOM-hidrazida), NHS-PEG₄-hidrazida protegida con acetona, NHS-PEG₄-hidrazida protegida con dimetilbencilcarbonilo, NHS-PEG₄-hidrazida protegida con trimetilbenciloxycarbonilo; o un reticulador de fórmula:



o cualquier combinación de los mismos.

25 2. El método de la reivindicación 1, en donde la enzima lisosomal comprende α -glucosidasa ácida (rhGAA), α -galactosidasa ácida A (GLA), β -glucuronidasa ácida (GUS), α -iduronidasa A ácida (IduA), iduronidato 2-sulfatasa ácida (12S), β -hexosaminidasa A (HexA), β -hexosaminidasa B (HexB), α -manosidasa A ácida, β -

glucocerebrosidasa (GlcCerasa), lipasa ácida (LPA) o cualquier combinación de las mismas, y en donde, opcionalmente, la enzima lisosomal es humana.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el primer agente reticulador comprende N-succinimidil-4-formilbenzamida (S-4FB).
- 5 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el péptido de direccionamiento lisosomal con un grupo hidrazida en el residuo terminal N se agrega en el paso (d) a un exceso molar de aproximadamente cuatro veces.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se agrega anilina en el paso (d).
- 10 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el vIGF2 comprende una de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye además, después del paso (b), liofilizar el vIGF2 modificado por hidrazida.

Figura 1

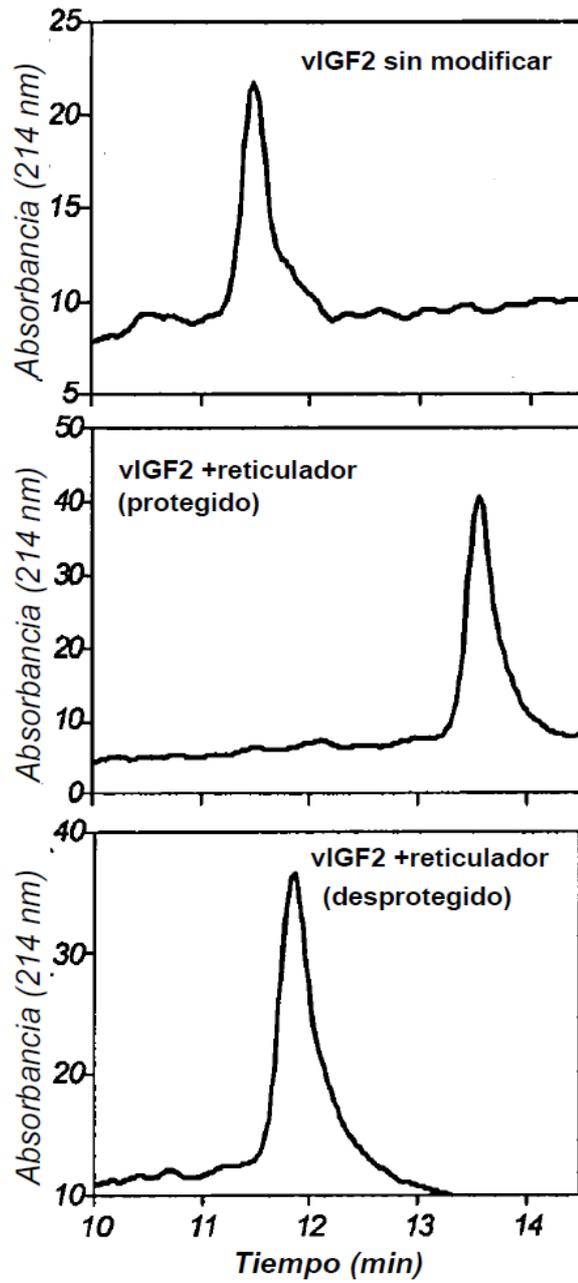


Figura 2

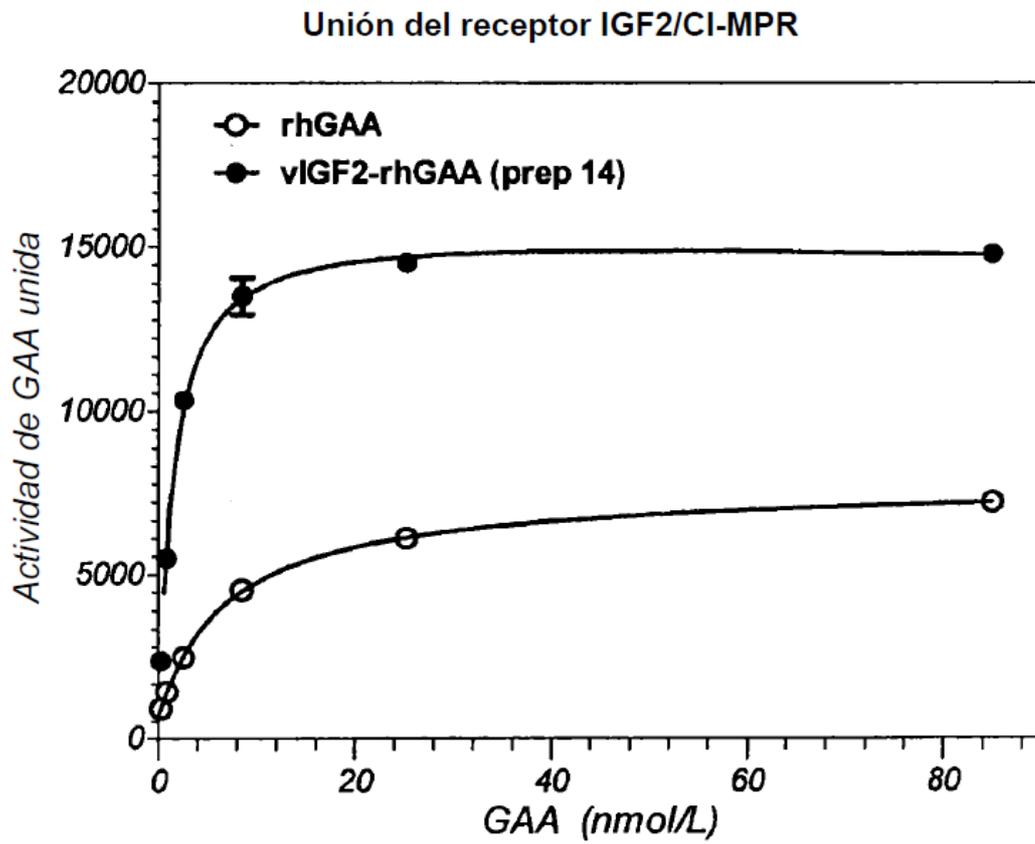
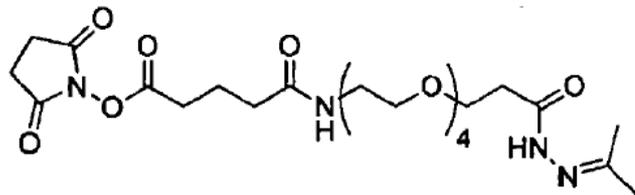
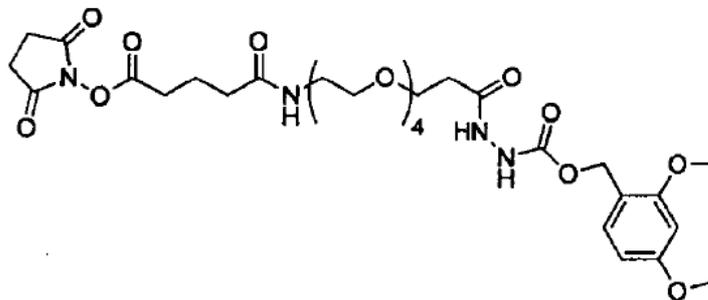


Figura 3

NHS-PEG₄-hidrazida protegida por acetona



NHS-PEG₄-hidrazida protegida por dimetilbenciloxycarbonilo



NHS-PEG₄-hidrazida protegida por trimetilbenciloxycarbonilo

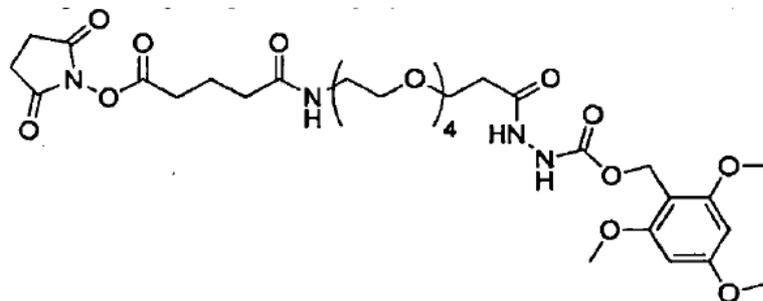


Figura 4

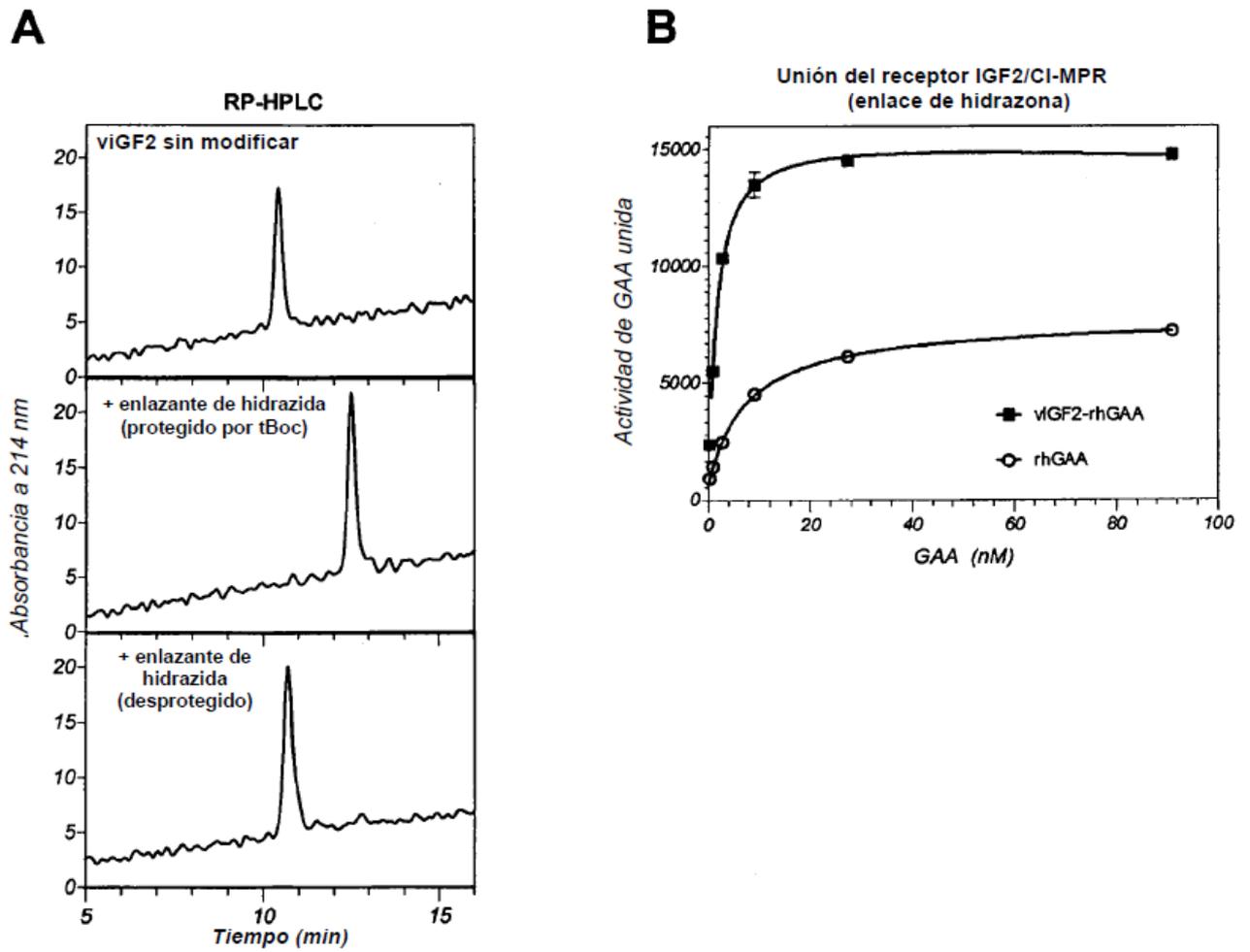
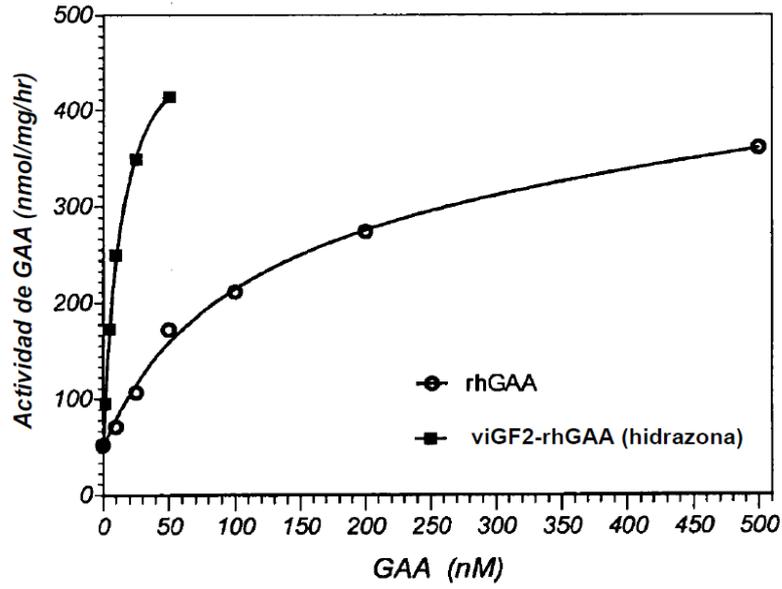


Figura 5

A

Captación de mioblastos L6



B

Western Blot de GAA
(lisados de mioblastos L6)

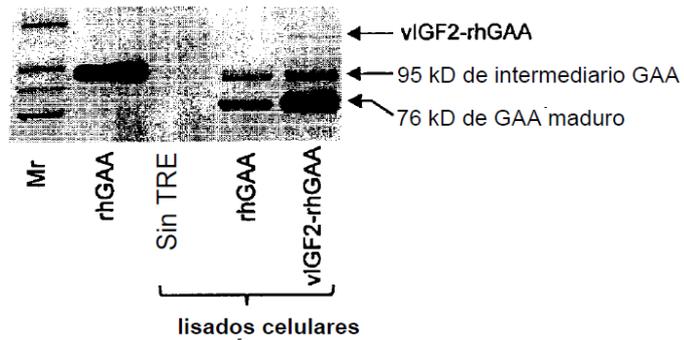


Figura 6

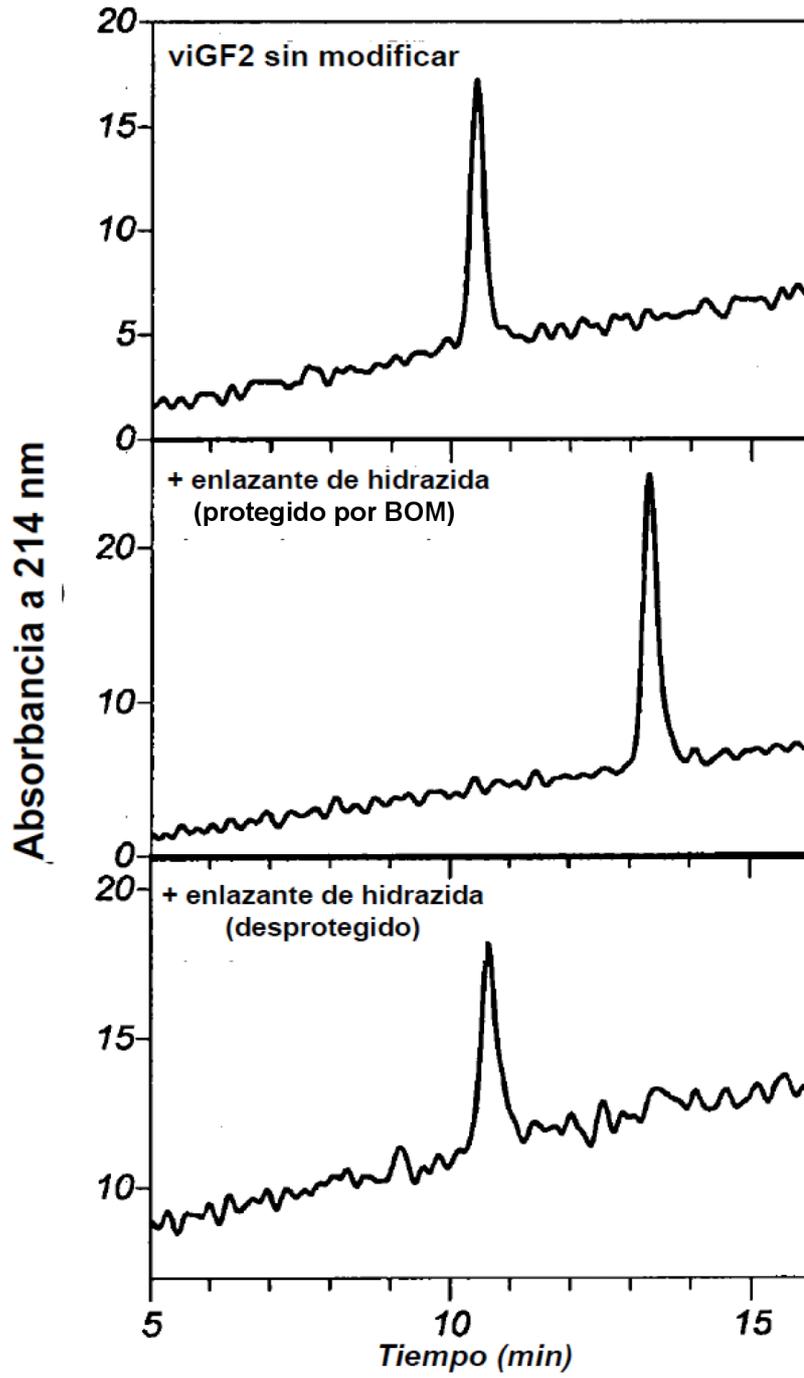
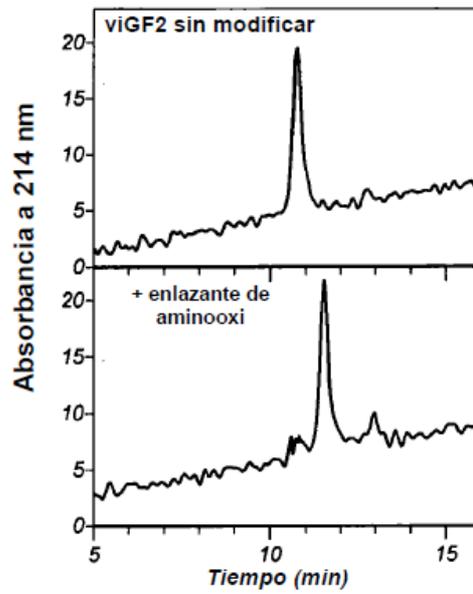


Figura 7

A



B

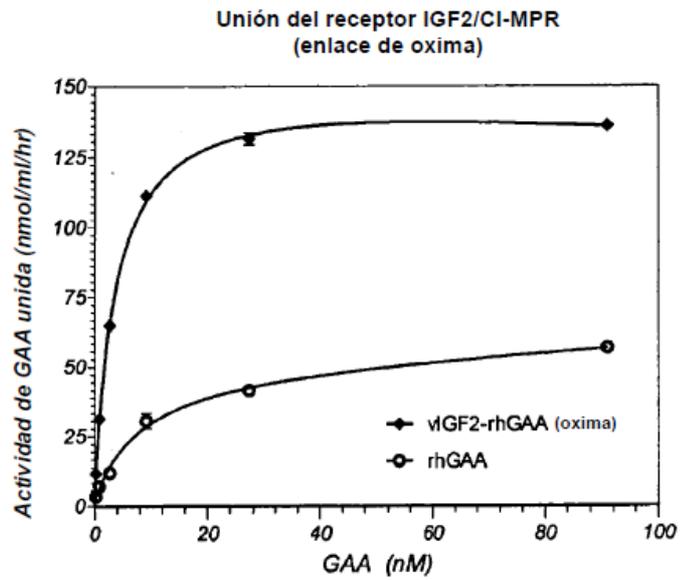


Figura 8

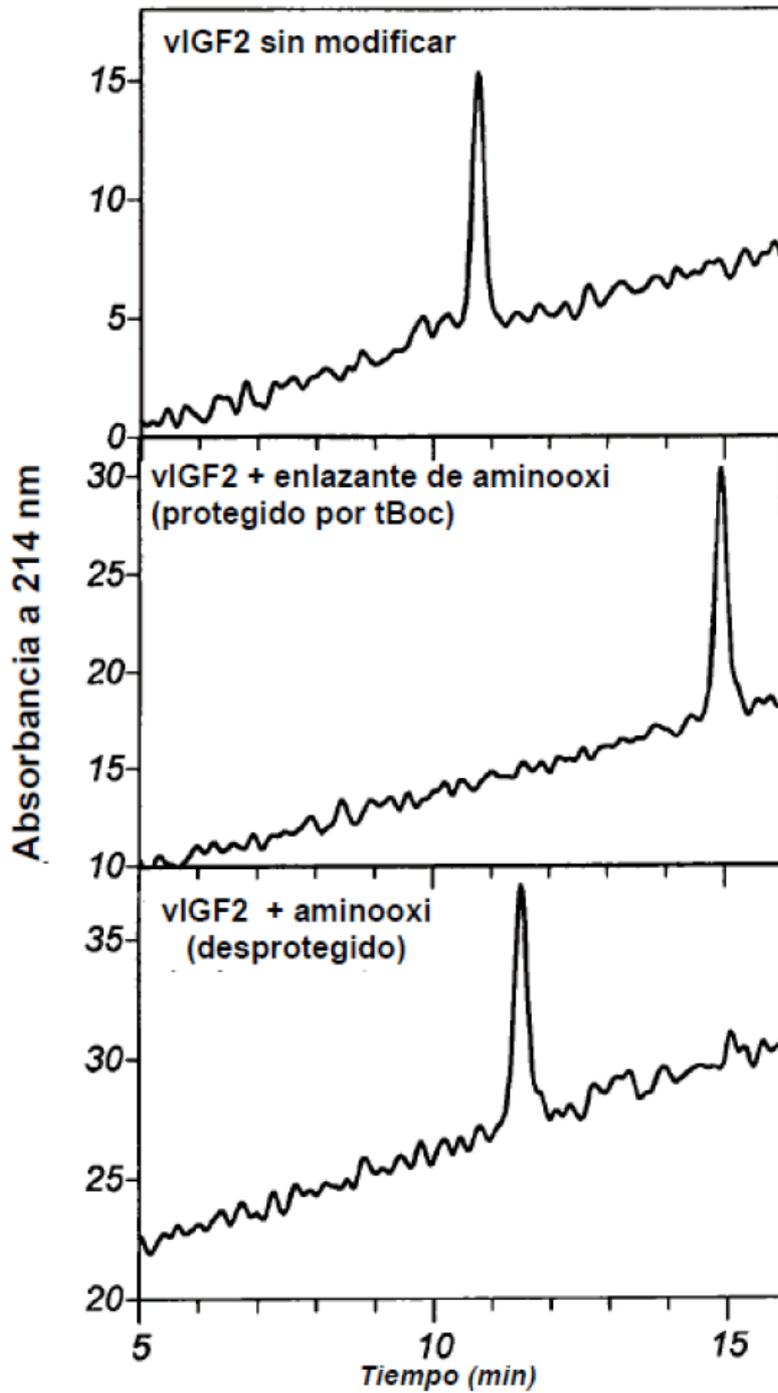


Figura 9

