



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0316039-4 B1**



**(22) Data do Depósito: 07/11/2003**

**(45) Data de Concessão: 29/08/2017**

**(54) Título:** PRECURSOR DE N-ACETILGALACTOSAMINA-4-SULFATASE, MÉTODOS DE TRATAMENTO USANDO A ENZIMA E MÉTODOS PARA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/46; C12N 9/14; C12N 1/02; C12N 15/00; C07H 21/04

**(30) Prioridade Unionista:** 07/11/2002 US 10/290,908

**(73) Titular(es):** BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.

**(72) Inventor(es):** MINMIN QIN; JOHN M. HENSTRAND; GARY N. ZECHERLE; DAN J. WENDT; WAI-PAN CHAN; LIN CHEN; PAUL A. FITZPATRICK; CHRISTOPHER M. STARR; STUART SWIEDLER

**PRECURSORA DE N-ACETILGALACTOSAMINA-4-SULFATASE, MÉTODOS DE  
TRATAMENTO USANDO A ENZIMA E MÉTODOS PARA PRODUÇÃO E  
PURIFICAÇÃO DA ENZIMA**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5        A presente invenção está no campo da medicina clínica, da bioquímica e da biologia molecular. A presente invenção apresenta terapêutica e métodos para o tratamento de mucopolissacaridose VI, assim como os procedimentos para produção e purificação para se produzir tal terapêutica.

10        **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

      A MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy) é uma doença de armazenamento lisossomial, na qual os pacientes afetados carecem da enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB). A enzima metaboliza a porção de sulfato de glicosaminoglicano (GAC) e dermatano (Neufeld et al., "The Mucopolysaccharidoses" The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver et al., New York: McGraw-Hill, 1989, página 1565-1587). Na ausência da enzima, a degradação em etapas de sulfato de dermatano é bloqueada e o substrato se acumula intracelularmente nos lisossomos, em uma ampla gama de tecidos. A acumulação causa um distúrbio progressivo com envolvimento de múltiplos órgãos e tecidos, nos quais o infante parece normal ao nascer, mas, usualmente, morre antes da puberdade. O diagnóstico de MPS VI é, geralmente, feito aos 6 - 24 meses de idade, quando as crianças mostram progressiva desaceleração de crescimento, fígado e baço aumentados, deformidades no esqueleto, características faciais grosseiras, obstrução das vias aéreas superiores e deformidades nas juntas. O enevoamento progressivo das córneas, hidrocéfalo comunicante ou doença cardíaca podem se desenvolver em crianças com MPS VI. Em geral, a morte resulta de infecção respiratória ou de doença cardíaca.

Diferente da MPS I, a MPS VI não está tipicamente associada com prejuízo progressivo do estado mental, embora limitações físicas possam causar impacto no aprendizado e no desenvolvimento. Embora a maioria dos pacientes com MPS VI tenham a forma severa da doença, que é usualmente fatal pelos anos da adolescência, tem sido descrito que os pacientes afetados com uma forma menos severa da doença têm sobrevivido durante décadas.

Várias publicações fornecem estimativas de incidência de MPS VI. Um levantamento da Colúmbia Britânica, de 1990, de todos os nascimentos entre 1952 e 1986, publicado por Lowry et al. (Lowry et al., *Human Genet.* 85: 389-390) (1990)) estima uma incidência de apenas 1 : 1.300.000. Um levantamento australiano (Meikle et al., *JAMA* 281 (3): 249-54) de nascimentos entre 1980-1996 encontrou 18 pacientes, para uma incidência de 1 : 248.000. Um levantamento na Irlanda do Norte (Nelson et al., *Hum. Genet.* 101: 355-358 (1997)) estimou uma incidência de 1 : 840.000. Finalmente, um levantamento proveniente dos Países Baixos, desde 1970 a 1996, calculou uma prevalência de nascimentos de 0,24 por 100.000 (Poorthuis et al., *Hum. Genet.* 105: 151-156 (1999)). Com base nesses levantamentos, estimou-se que existem entre 50 e 300 pacientes nos Estados Unidos, que são diagnosticados com todas as formas dessa síndrome.

Não há tratamento satisfatório para MPS VI, embora alguns poucos pacientes tenham se beneficiado de transplante de medula óssea (TMO) (Kravit et al., *N. Engl. J. Med.* 311 (25): 1606-11 (1984)). O TMO não está universalmente disponível devido à carência de um doador adequado e está associado com substancial morbidez e mortalidade. O Grupo Europeu para Transplante de Medula Óssea relatou uma mortalidade relacionada a transplante de 10% (idêntico HLA) a 20-25% (HLA não casado) para 63 casos

de transplante de distúrbios lisossomiais (Hoogerbrugge et al., Lancet 345: 1398-1402 (1995)). Diferente de TMO, a maioria dos pacientes recebe tratamento sintomático para problemas específicos, como a sua única forma de cuidado. É 5 um objeto da presente invenção fornecer terapia de reposição de enzima com N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana recombinante (rhASB). Nenhuma tentativa para se tratar humanos com rhASB foi feita. Igualmente, quaisquer dosagens clínicas ou formulações médicas aceitáveis foram 10 fornecidas. Inúmeras tentativas de reposição de enzima no modelo felino de MPS VI foram conduzidas.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção engloba a produção, purificação e o uso de uma composição compreendendo uma N- 15 acetilgalactosamina-4-sulfatase altamente purificada, na forma precursora. O ADN e a seqüência de aminoácidos da forma precursora são descritos em SEQ ID NOS: 1 e 2, respectivamente. A seqüência de sinal é prevista ser os aminoácidos 1-38 de SEQ ID NO: 2, e a produção recombinante 20 resultou em produto começando no resíduo de aminoácido 39 ou no 40 de SEQ ID NO: 2.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção apresenta novos métodos de tratamento de doenças causadas, no todo ou em parte, por uma deficiência de N-acetilgalactosamina-4- 25 sulfatase (ASB). Um método compreende a administração de uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a um paciente com necessidade de um tal tratamento. Na concretização preferida, a composição farmacêutica compreende N-acetilgalactosamina-4-sulfatase altamente 30 purificada na forma precursora, ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, isoladamente ou em combinação com um veículo farmaceuticamente adequado. O paciente sofre de uma doença causada, no todo ou em parte,

por uma deficiência de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase.

Em outras concretizações, esse método apresenta a transferência de um ácido nucléico codificando, no todo ou em parte, de uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) ou

5 um seu mutante ou análogo biologicamente ativo, para uma ou mais células de hospedeiro *in vivo*. Concretizações preferidas incluem a otimização da dosagem com relação às necessidades do organismo a ser tratado, de preferência, mamíferos ou humanos, para melhorar de maneira eficaz, os 10 sintomas da doença. Em concretizações preferidas, a doença é mucopolissacaridose VI (MPS VI) ou Síndrome de Maroteaux-Lamy.

Esse primeiro aspecto da invenção fornece especificamente métodos de tratamento de humanos sofrendo

15 de doenças causadas, no todo ou em parte, por uma deficiência de atividade de ASB, por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de ASB humana, de preferência, ASB humana recombinante. Portanto, a invenção contempla o uso de ASB humana na preparação de um

20 medicamento para o tratamento de uma deficiência de atividade de ASB, assim como uma composição farmacêutica contendo ASB humana para uso no tratamento de uma deficiência de atividade de ASB. A deficiência de atividade de ASB pode ser observada, por exemplo, como níveis de

25 atividade de 50% ou menos, 25% ou menos ou 10% ou menos comparados a níveis normais de atividade de ASB, e pode se manifestar como uma mucopolissacaridose, por exemplo, mucopolissacaridose VI (MPS VI) ou Síndrome de Maroteaux-Lamy. A quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade

30 suficiente para fornecer um efeito benéfico no paciente humano e, de preferência, fornece melhorias em qualquer um dos seguintes: mobilidade de juntas, dor ou rigidez, ou subjetivamente ou objetivamente; tolerância ou resistência

a exercícios, por exemplo, conforme medido por capacidade de caminhar ou de escalar; função pulmonar, por exemplo, conforme medida por FVC, FEV ou FET; acuidade visual; ou atividades da vida diária, por exemplo, conforme medida por capacidade de se levantar a partir do estado sentado, vestir-se ou despir-se, ou pegar pequenos objetos. A ASB humana é, de preferência, administrada como preparação recombinante altamente purificada, conforme aqui descrito. Preparações preferidas contêm rhASB com uma pureza maior do que 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ou 99,9%, conforme medida por HPLC de fase reversa. Preparações preferidas também contêm a forma precursora de ASB em elevada pureza, de modo que formas processadas de ASB não são detectadas em SDS-PAGE manchados com Coomassie. Muitíssimo de preferência, a pureza da forma precursora de ASB é maior do que 95%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ou 99,9%, conforme medida por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)-HPLC. A ASB humana, de preferência, é também formulada com um tensoativo ou detergente não iônico, conforme aqui descrito, opcionalmente excluindo-se uma formulação com polioxietileno sorbitano 20 ou 80 à 0,001%.

Constatou-se que a administração de rhASB em doses abaixo de 1 mg/Kg por semana, por exemplo, à 0,2 mg/Kg por semana, tem um efeito benéfico. A invenção contempla doses de pelo menos 0,1 mg/Kg, 0,2 mg/Kg, 0,5 mg/Kg, 0,75 mg/Kg, 1 mg/Kg ou 1,5 mg/Kg por semana, e podem variar até 2 mg/Kg, 4 mg/Kg, 5 mg/Kg, ou maiores doses por semana. A dose preferida é de 1 mg/Kg/semana. De preferência, tais doses são administradas uma vez por semana, mas, opcionalmente, podem ser divididas em quantidades iguais cobrindo períodos de tempo mais freqüentes, tais como duas vezes por semana ou diariamente. Contempla-se uma variedade

de rotas de administração parenteral ou não parenteral, incluindo oral, transdérmica, transmucosal, intrapulmonar (incluindo aerossolizada), intramuscular, subcutânea ou intravenosa, que entreguem dosagens equivalentes.

5 Administração por injeção de bolo ou infusão diretamente nas juntas de CSF é também especificamente contemplada, tal como intratecal, intracerebral, intraventricular, via punção lombar ou via cisterna magna. Conhece-se uma variedade de meios no estado da técnica para se conseguir 10 tal administração intratecal, incluindo bombas, reservatórios, agulhas ou implantes. De preferência, as doses são entregues via infusões intravenosas durando 1, 2 ou 4 horas, muitíssimo de preferência, 4 horas, mas, pode-se também entregar por um bolo intravenoso.

15 Outros meios de aumentar a atividade de ASB nos pacientes humanos são também contemplados, incluindo terapia de gene, que faz com que o paciente aumente, de maneira transiente ou permanente, a expressão de ASB exógena ou endógena. A transferência de um gene hASB 20 exógeno ou de um promotor que aumente a expressão do gene hASB endógeno é possível através de uma variedade de meios conhecidos no estado da técnica, incluindo vetores virais, recombinação homóloga ou injeção direta de ADN.

Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta 25 novas composições farmacêuticas compreendendo um N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, útil para tratar uma doença causada, no todo ou em parte, por uma deficiência de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB). Na 30 concretização preferida, N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase. Tais composições podem ser adequadas para administração de inúmeras maneiras, tal como administração parenteral,

tópica, intranasal, por inalação ou oral. Dentro do escopo desse aspecto, estão concretizações apresentando seqüências de ácidos nucléicos codificando, no todo ou uma parte de, N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB), que possa ser 5 administrada *in vivo* em células afetadas com uma deficiência de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB).

Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta um método para produzir um N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo 10 biologicamente ativo, em quantidades que permitam usar a enzima terapeuticamente. Em uma ampla concretização, o método compreende a etapa de transferir um cADN que codifique, no todo ou uma parte de, uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu mutante ou 15 análogo biologicamente ativo, em uma célula adequada para a sua expressão. Na concretização preferida, as células são cultivadas em uma cultura constante ou contínua ou em perfusão. Em outra concretização, as células são cultivadas em um meio que careça de G418. Em algumas concretizações, 20 um cADN que codifique uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) completa é usado, de preferência, uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) humana. Entretanto, em outras concretizações, pode ser usado um cADN que codifique um seu fragmento ou mutante biologicamente ativo. 25 Especificamente, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas, enquanto se preserve ou intensifique a atividade biológica da enzima. Em outras concretizações preferidas, usa-se um vetor de expressão para transferir c cADN para uma célula ou linhagem de células adequada para a 30 sua expressão. Em uma concretização particularmente preferida, o cADN é transfetado em uma célula de Ovário de Hamster Chinês (sigla, em inglês, CHO), tal como a linhagem de células CHO-K1. Ainda em outras concretizações

preferidas, o procedimento de produção compreende as seguintes etapas: (a) cultivar as células transfectadas com ADN que codifica toda ou um fragmento ou mutante biologicamente ativo de uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana, em um meio de cultura adequado, até uma densidade apropriada, (b) introduzir as células transfectadas em um biorreator, (c) suprir um meio de cultura adequado ao biorreator e (d) separar as células transfectadas a partir dos meios contendo a enzima.

10 Em um quarto aspecto, a presente invenção fornece uma linhagem de células transfectadas, que apresenta a capacidade de produzir N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) em quantidades que permitam usar a enzima terapeuticamente. Em uma concretização preferida, a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase é precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase. Em concretizações preferidas, a presente invenção apresenta uma linhagem de células de CHO recombinantes, tais como a linhagem de células CHO K1, que produz, de maneira estável e confiável, 15 quantidades de uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou de um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, que permita usar a enzima terapeuticamente. Especialmente preferida é a linhagem de células CHO K1 designada como CSL4S-342. Em algumas concretizações 20 preferidas, a linhagem de células transgênicas contém uma ou mais cópias de um construto de expressão. De preferência, a linhagem de células transgênicas contém cerca de 10 ou mais cópias do construto de expressão. Em concretizações ainda mais preferidas, a linhagem de células 25 expressa a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) recombinante ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, em quantidades de pelo menos 20 a 40 microgramas por  $10^7$  células por dia.

Em um quinto aspecto, a presente invenção novos vetores adequados para produzir N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, em quantidades que 5 permitam usar a enzima terapeuticamente.

Em um sexto aspecto, a presente invenção fornece nova N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, produzida de acordo com os métodos da presente invenção e, 10 por meio disso, presente em quantidades que permitam usar a enzima terapeuticamente. A atividade específica da N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) de acordo com a presente invenção está, de preferência, na faixa de 20 a 90 unidades, e, mais preferivelmente, maior do que cerca de 50 15 unidades por mg de proteína. Na concretização preferida, a N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) é precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase altamente purificada.

Em um sétimo aspecto, a presente invenção apresenta um novo método para purificar a N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo. De acordo com uma primeira concretização, uma massa de células transfetadas é cultivada e removida, deixando a enzima recombinante. Materiais exógenos devem ser normalmente separados da massa 25 bruta, para evitar a deposição microbiológica nas colunas. De preferência, o meio de crescimento contendo a enzima recombinante é passado através de uma etapa de ultracentrifugação. Em outra concretização preferida, o método para purificar a N-acetilgalactosamina-4-sulfatase 30 precursora compreende: (a) obter um fluido contendo a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase; (b) reduzir a atividade proteolítica de uma protease no fluido capaz de clivar a precursora de N-acetilgalactosamina-4-

sulfatase, sendo que a redução não prejudica a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase; (c) colocar em contato o fluido com uma resina de cromatografia de interação com corante azul de Cibracon; (d) colocar em 5 contato o fluido com uma resina de cromatografia de quelação com cobre; (e) colocar em contato o fluido com uma resina de cromatografia de interação hidrofóbica com fenila; (f) recuperar a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase. De preferência, as etapas 10 (c), (d) e (e) podem ser realizadas seqüencialmente. Os técnicos especializados no assunto apreciam que uma ou mais das etapas de cromatografia podem ser omitidas ou substituídas, ou que a ordem das etapas de cromatografia pode ser modificada dentro do escopo da presente invenção. 15 Em outras concretizações preferidas, o eluente a partir da coluna de cromatografia final é ultrafiltrado / diafiltrado, e uma etapa apropriada é realizada para remover quaisquer vírus remanescentes. Finalmente, etapas esterilizantes apropriadas podem ser realizadas, se 20 desejado.

#### DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 fornece um fluxograma do método para produzir uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) humana de acordo com a presente invenção.

25 A Figura 2 fornece um fluxograma do método para purificar uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) humana de acordo com o método de processo em batelada (Tabela 14).

A Figura 3 fornece o fluxograma do método de 30 purificação de uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) humana de acordo com o método de processo de perfusão (Tabelas 14 e 15).

As Figuras 4A-4C retratam resultados obtidos para os cromatogramas da coluna de Blue-Sepharose (Figura 4A), coluna de Cobre Quelante-Sepharose (Figura 4B) e coluna de Fenil-Sepharose (Figura 4C).

5 A Figura 5 retrata um gel de gradiente de poliacrilamida de 4-20%, mostrando o resultado de uma SDS-PAGE tingida com prata, do método de purificação do processo de perfusão (Tabelas 14 e 15).

10 As Figuras 6A-6F retratam os resultados em géis de SDS de gradiente de poliacrilamida de 4-20% das seguintes amostras: raia 1, padrões de peso molecular pré-tingidos de amplo espectro NEB (PM em KDa); raia 2, 5 µg de ASB a partir do lote AS60001 (antigo processo em batelada); raia 15 3, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 (processo de perfusão); raia 4, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 UF10 (processo de perfusão); raia 5, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 UF15 (processo de perfusão); raia 6, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 AUF18 (processo de perfusão); raia 7, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 20 AUF22 (processo de perfusão); raia 8, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 AUF25 (processo de perfusão); e raia 9, 5 µg de ASB a partir do lote AP60109 AUF27 (processo de perfusão). Os géis são tingidos ou com Coumassie R-250 ou com prata.

25 A Figura 7A retrata os resultados em géis de SDS de gradiente de poliacrilamida de 4-20% tingidos com prata. A Figura 7B retrata os resultados em géis de SDS de gradiente de poliacrilamida de 4-20% tingidos com Coomassie. Raia 1, lote AP60202 UF4; raia 2, lote AP60202 UF10; raia 3, lote 30 AP60202 UF18; raia 4, lote AP60202 (BMK); raia 5, lote 102PD0139x B3; raia 6, lote 102PD139x B5; raia 7, lote padrão de referência de perfusão rhASB-202-002; raia 8,

lote 102PD0139 P1; raia 9, lote 102PD0139 P2; e raia padrão Mark 12 (PM em KDa).

As Figuras 8A-8C retratam perfis obtidos para a coluna de Blue-Sepharose (Figura 8A), coluna de Cobre Quelante-Sepharose (Figura 8B) e coluna de Fenil-Sepharose (Figura 8C). Na Figura 8B, a atividade de catepsina está indicada pela linha vermelha.

A Figura 9 retrata os resultados de géis de SDS de gradiente de poliacrilamida de 4-20%. A Figura 9B retrata os resultados das proteínas transferidas do gel da Figura 9A, transferida para nitrocelulose e sondada pelos anticorpos anti-rhASB. A Figura 9C retrata os resultados das proteínas transferidas do gel da Figura 9A, transferidas para nitrocelulose e sondadas por anticorpos anti-catepsina. BioLabPreStain indica padrões de peso molecular (PM em KDa (kilodaltons)).

A Figura 10 mostra níveis séricos de anticorpos anti-ASB durante 96 semanas de tratamento com rhASB em um estudo clínico de Fases 1/2, em humanos.

A Figura 11 mostra a redução nos níveis de GAG urinário totais durante 96 semanas de tratamento com rhASB em um estudo clínico de Fases 1/2, em humanos.

A Figura 12 mostra uma comparação de níveis de GAG urinários na semana 96, em humanos tratados com rhASB com relação a níveis normais apropriados à idade.

A Figura 13 mostra o aperfeiçoamento nos resultados do teste de caminhada de 6 minutos durante 96 semanas de tratamento com rhASB em um estudo clínico de Fases 1/2, em humanos.

A Figura 14 mostra níveis séricos de anticorpos anti-ASB durante 48 semanas de tratamento em um estudo clínico de Fase 2, em humanos.

A Figura 15 mostra a redução nos níveis de GAG urinário durante 48 semanas de tratamento em um estudo clínico de Fase 2, em humanos.

A Figura 16 mostra uma comparação de níveis na semana 5 48, em humanos tratados com rhASB com relação a níveis normais apropriados à idade.

A Figura 17 mostra o aperfeiçoamento nos resultados do teste de caminhada de 12 minutos, durante 48 semanas de tratamento em um estudo clínico de Fase 2, em humanos.

10 A Figura 18 mostra o aperfeiçoamento nos resultados no teste de subir escadas por 3 minutos, durante 48 semanas de tratamento em um estudo clínico de Fase 2, em humanos.

A Figura 19 mostra os resultados no Teste de Tempo Estendido de Levantar e ir, durante 48 semanas de 15 tratamento em um estudo clínico de Fase 2, em humanos.

As Figuras 20 e 21, respectivamente, mostram os resultados dos questionários de dor de junta e de rigidez de junta, durante 48 semanas de tratamento em um estudo clínico de Fase 2, em humanos.

20 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção engloba a produção, a purificação e o uso de uma composição compreendendo uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase altamente purificada na forma precursora. A pureza de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase na forma precursora é pelo menos igual a ou maior do que 95, 96, 97 ou 98% em proteína total, conforme determinado pelo método de HPLC de fase reversa. De preferência, a pureza é pelo menos igual a ou maior do que 99%. Mais preferivelmente, a pureza é pelo menos igual a ou 25 maior do que 99,1, 99,2, 99,3 ou 99,4%. Ainda mais preferivelmente, a pureza é pelo menos igual a ou maior do que 99,5, 99,6, 99,7 ou 99,8%. Ainda muito mais preferivelmente, a pureza é pelo menos igual a ou maior do 30

que 99,9%. A pureza da precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é medida usando-se o método de HPLC de fase reversa (ver o Exemplo 9). A pureza da precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é aquela por meio da qual a composição é essencialmente livre de quaisquer contaminantes de proteínas celulares ou N-acetilgalactosamina-4-sulfatase processada, degradada ou madura, que sejam detectáveis pelo método de HPLC de fase reversa. Toda pureza percentual é baseada na proteína total, conforme determinada pelo método de HPLC de fase reversa. A pureza elevada, reproduzível de maneira consistente, obtida usando-se o processo de purificação revelado aqui, torna possível tratar esses pacientes que exigem tratamento crônico, de longa duração, com preparações de rhASB de elevada pureza, administradas a cada tratamento, por exemplo, semanalmente. Portanto, a invenção contempla a administração de rhASB precursora de tal pureza elevada, durante um período de tempo longo, por exemplo, 12 semanas, 24 semanas, 48 semanas, 96 semanas ou mais.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção apresenta novos métodos de tratamento de doenças causadas, no todo ou em parte, por uma deficiência de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB). Em uma concretização, esse método apresenta a administração de uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) recombinante ou de um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, isoladamente ou em combinação com veículo farmaceuticamente adequado. Em outras concretizações, esse método apresenta a transferência de um ácido nucléico, que codifica, no todo ou em parte, uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu mutante biologicamente ativo, em uma ou mais células hospedeiras *in vivo*. Concretizações preferidas incluem a

otimização da dosagem às necessidades dos organismos a serem tratados, de preferência, mamíferos ou humanos, para melhorar, de maneira eficaz esses sintomas. Em concretizações preferidas, a doença é mucopolissacaridose 5 VI (MPS VI), Síndrome de Maroteaux-Lamy.

A pureza da precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é aquela por meio da qual a composição é essencialmente livre de quaisquer proteínas celulares contaminantes, que possam causar uma reação imunológica ou 10 alérgica pelo paciente ao qual se administra a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase. Uma composição é essencialmente livre de tais proteínas celulares do hospedeiro, se a composição, quando administrada a um paciente, não provoca qualquer reação imunológica ou 15 alérgica. A elevada pureza da precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é importante para evitar uma reação imunológica ou alérgica pelo paciente com relação às impurezas presentes na composição farmacêutica. Isso é especialmente verdade em relação a proteínas das 20 células, a partir das quais a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é purificada. Quando a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase recombinante é expressa e purificada a partir de células de Ovário de Hamster Chinês, as proteínas de Ovário de Hamster 25 Chinês podem causar reações imunológicas ou alérgicas (por exemplo, picadas) no paciente. O único meio de se evitar esse tipo de reação é assegurar que a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase seja suficientemente pura, de modo que as proteínas de Ovário de Hamster Chinês não 30 estejam em quantidade suficiente para provocar tal(is) reação(ões). A pureza da composição farmacêutica é especialmente importante quando os pacientes são aqueles

que sofrem de MPS VI e já estão, portanto, imunologicamente comprometidos.

De preferência, também, a pureza da precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) é tal que a composição tem somente traços de formas processadas ou degradadas. As proteases presentes nas células de hospedeiro clivam a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase em formas de pesos moleculares mais baixos. Ainda que algumas dessas formas possam também ser enzimaticamente ativas, a forma precursora é preferível para a assimilação celular e direcionamento ao lisossoma, e, portanto, é desejável uma maior quantidade de ASB precursora não processada na preparação final. Além disso, formas degradadas de ASB no produto de droga também podem ensejar incidência mais elevada ou maiores quantidades de anticorpos em relação à própria ASB, o que é altamente indesejável nos casos tais como esse, em que é necessária a terapia de longa duração de pacientes. O processo de purificação por perfusão, descrito aqui, resulta em uma preparação altamente pura, a qual é essencialmente livre de contaminantes de proteínas celulares de hospedeiro ou de formas de ASB processadas/agregadas, como testado pela combinação de SDS-PAGE, HPLC de fase reversa e SEC-HPLC. Quando administrada a humanos, o produto produzido por esse processo parece ter uma meia-vida maior.

A indicação para N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana recombinante (rhASB) é para o tratamento de MPS VI, também conhecida como Síndrome de Maroteaux-Lamy. De acordo com concretizações preferidas, uma dose inicial de 1 mg/Kg (cerca de 50 U/Kg) é fornecida a pacientes sofrendo de uma deficiência de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase. De preferência, a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase é administrada semanalmente por injeção. De acordo com outras

concretizações preferidas, os pacientes que não demonstrem uma redução de excreções urinárias de glicosaminoglicano de pelo menos cinqüenta por cento são deslocados para a uma dosagem de 2 mg/Kg (cerca de 100 U/Kg) dentro de cerca de 5 três meses da dosagem inicial. De preferência, a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (rhASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, é administrada intravenosamente durante aproximadamente um período de quatro horas, uma vez por semana, de preferência 10 durante tanto tempo quanto persistirem os sintomas clínicos significativos da doença. Além disso, de preferência, a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (rhASB) é administrada por um cateter intravenoso, colocado na veia cefálica ou em outra veia apropriada, com uma infusão de salina começando 15 em cerca de 30 cm<sup>3</sup>/h. Adicionalmente, de preferência, a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (rhASB) é diluída em cerca de 250 cm<sup>3</sup> de salina normal.

Em um segundo aspecto, a presente invenção apresenta novas composições farmacêuticas compreendendo N- 20 acetilgalatosamina-4-sulfatase (rhASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, útil para tratamento de uma deficiência de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase. A enzima recombinante pode ser administrada de inúmeras maneiras, em adição às 25 concretizações preferidas descritas acima, tais como administração parenteral, tópica, intranasal, por inalação ou oral. Outro aspecto da invenção é fornecer a administração da enzima por sua formulação com um veículo farmaceuticamente aceitável, que pode ser sólido, semi- 30 sólido ou líquido ou uma cápsula ingerível. Exemplos de composições farmacêuticas incluem comprimidos, pastilhas, tais como pastilhas nasais, composições para aplicação tópica, tais como pomadas, geléias, cremes e suspensões,

aerossóis para inalação, spray nasal, lipossomas. Usualmente, a enzima recombinante compreende entre 0,05 e 99% ou entre 0,5 e 99% em peso da composição, por exemplo, entre 0,5 e 20% para composições pretendidas para injeção, 5 e entre 0,1 e 50% para composições pretendidas para administração oral.

Para produzir composições farmacêuticas nessa forma de unidades de dosagem para aplicação oral contendo uma enzima terapêutica, a enzima pode ser misturada com um veículo sólido, pulverulento, por exemplo, lactose, sacarose, sorbitol, manitol, um amido, tal como amido de batata, amido de milho, amilopectina, pó de laminária ou pó de polpa de citros, um derivado de celulose ou gelatina, e também pode incluir lubrificantes, tais como estearato de cálcio ou de magnésio ou uma Carbowax ou outras ceras de polietilenoglicol, e comprimidas para formar comprimidos ou núcleos para drágeas. Se forem necessárias drágeas, os núcleos podem ser revestidos, por exemplo, com soluções de açúcar concentradas, que podem conter goma arábica, talco e/ou dióxido de titânio, ou, alternativamente, com um agente formador de filme dissolvido em solventes orgânicos de elevada volatilidade ou misturas de solventes orgânicos. Corantes podem ser adicionados a esses revestimentos, por exemplo, para se distinguir entre diferentes teores de substância ativa. Para a composição de cápsulas de gelatina mole consistindo em gelatina e, por exemplo, glicerol, como um plastificante, ou cápsulas fechadas similares, a substância ativa pode ser adicionada sob mistura com uma Carbowax ou um óleo adequado, como, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de oliva ou óleo de araquis. Cápsulas de gelatina dura podem conter granulados da substância ativa com veículos sólidos, pulverulentos, tais como lactose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, tais como amido de

batata, amido de milho ou amilopectina, derivadas de celulose ou gelatina, e também podem incluir estearato de magnésio ou ácido esteárico, como lubrificantes.

Enzimas terapêuticas da presente invenção também podem 5 ser administradas parenteralmente, tal como por injeção subcutânea ou intravenosa, ou por injeção única ou infusão com bomba ou por implante subcutâneo de liberação sustentada, e enzimas terapêuticas podem ser administradas por inalação. Em injeção subcutânea, intramuscular e 10 intravenosa, a enzima terapêutica (o ingrediente ativo) pode estar dissolvida ou dispersada em um veículo carreador líquido. Para a administração parenteral, o material ativo pode ser adequadamente adicionado sob mistura com um veículo aceitável, de preferência, da variedade de óleo 15 vegetal, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão e os similares. Outros veículos parenterais, tais como composições orgânicas usando solketal, glicerol, formol, e formulações parenterais aquosas também podem ser usadas.

20 Para aplicação parenteral por injeção, as composições podem compreender uma solução aquosa de um sal farmaceuticamente aceitável solúvel em água dos ácidos ativos de acordo com a invenção, de maneira desejável em uma concentração de 0,5 a 10%, e, opcionalmente, também, um 25 agente estabilizante e/ou substâncias tampão em solução aquosa. Unidades de dosagem da solução podem ser acondicionadas, de maneira vantajosa, em ampolas.

Quando enzimas terapêuticas são administradas na forma de um implante subcutâneo, o composto é suspenso ou 30 dissolvido em um material de dispersão lenta conhecido pelos técnicos especializados no assunto, ou administrado em um dispositivo que libere lentamente o material ativo, por meio do uso de uma força motriz constante, tal como uma

bomba osmótica. Em tais casos, é possível a administração durante um período de tempo estendido.

Para a aplicação tópica, as composições farmacêuticas estão adequadamente na forma de uma pomada, suspensão 5 celular, creme ou similares. A quantidade de substância ativa pode variar, por exemplo, entre 0,05 - 20% em peso da substância ativa. tais composições farmacêuticas para aplicação tópica podem ser preparadas de maneira conhecida por mistura da substância ativa com materiais de veículo 10 conhecidos, tais como isopropanol, glicerol, parafina, álcool estearylílico, polietileno glicol, etc. O veículo farmaceuticamente aceitável também pode incluir um promotor de absorção química conhecido. Exemplos de promotores de absorção são, por exemplo, dimetilacetamida (patente norte- 15 americana Nº 3.472.931), tricloro-etanol ou trifluoro- etanol (patente norte-americana Nº 3.891.757), certos alcoóis e suas misturas (patente britânica Nº 1.001.949). Um material de veículo para a aplicação tópica para pele 20 íntegra é também descrito no relatório descritivo de patente britânica Nº 1.464.975, que revela um material de veículo consistindo em um solvente compreendendo 40 - 70% (v/v) de isopropanol e 0 - 60% (v/v) de glicerol, o restante, se houver, sendo um constituinte inerte de um diluente, não excedendo 40% do volume total de solvente.

25 A dosagem, na qual as composições farmacêuticas contendo enzima terapêutica são administradas, pode variar dentro de uma ampla faixa e dependerá de vários fatores, tais como, por exemplo, da severidade da doença, da idade do paciente, etc, e podem ter que ser individualmente 30 ajustados. Como uma possível faixa para a quantidade de enzima terapêutica, que pode ser administrada por dia, mencione-se desde cerca de 0,1 mg a cerca de 2.000 mg, ou desde cerca de 1 mg a cerca de 2.000 mg.

As composições farmacêuticas contendo a enzima terapêutica podem ser adequadamente formuladas de modo que elas forneçam doses dentro dessas faixas ou como unidades de dosagem única ou como unidades de dosagem múltipla. Além 5 de conter uma enzima terapêutica (ou enzimas terapêuticas), as formulações de acordo com a invenção podem conter uma ou mais substâncias ou cofatores para a reação catalisada pela enzima terapêutica nas composições. Composições contendo enzimas terapêuticas podem também conter mais do que uma 10 enzima terapêutica. Igualmente, a enzima terapêutica pode estar em forma conjugada estando ligada à outra porção, por exemplo, PEG. Adicionalmente, a enzima terapêutica pode conter uma ou mais porções de alvo ou peptídeos de trânsito 15 para auxiliar a entrega a um tecido, órgão ou organela de interesse.

A enzima recombinante empregada nos métodos e composições de acordo com a invenção também pode ser administrada por meio de transformação de células do paciente com ácidos nucléicos que codifiquem a N- 20 acetilgalactosamina-4-sulfatase ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo. A seqüência de ácidos nucléicos que codifica assim pode ser incorporada em um vetor para transformação em células do paciente a ser tratado. Concretizações preferidas de tais vetores são aqui 25 descritas. O vetor pode ser projetado de modo a se integrar nos cromossomos do destinatário, por exemplo, vetores retrovirais, ou para replicar-se autonomamente nas células hospedeiras. seqüências de nucleotídeos contendo vetores, codificando N-acetilgalactosamina-4-sulfatase, podem ser 30 projetadas de modo a fornecerem expressão continua ou regulada da enzima. Adicionalmente, o vetor genético codificando a enzima pode ser projetado de modo a se integrar de maneira estável ao genoma celular ou de modo a

estar presente somente de maneira transiente. A metodologia geral de terapia genética convencional pode ser aplicada a sequências de polinucleotídeos que codifiquem N-acetilgalactosamina-4-sulfatase. Revisões de técnicas de 5 terapia genética convencional podem ser encontradas em Friedman, Science 244: 1275-1281 (1989); Ledley, J. Inherit. Aletab. Dis. 13:587-616 (1990); e Tososhev, et al., Curr. Opinions Biotech. 1:55-61 (1990).

Um método particularmente preferido de administração 10 da enzima recombinante é intravenosamente. Uma composição particularmente preferida compreende N-acetilgalactosamina-4-sulfatase recombinante, salina normal, tampão de fosfato para manter o pH em cerca de 5 - 7, e albumina humana. A composição pode incluir adicionalmente polioxietileno 15 sorbitano, tais como 20 ou 80 (Tween 20 ou Tween 80) para melhorar a estabilidade e prolongar a vida de prateleira. Alternativamente, a composição pode incluir qualquer tensoativo ou detergente não iônico conhecido na técnica, incluindo, mas, não limitados a polioxietileno sorbitano 40 20 ou 60; ésteres de ácidos graxos de polioxietileno; monoisoestearatos de polioxietileno sorbitano; poloxâmeros, tais como poloxâmero 188 ou poloxâmero 407; octoxinol-9 ou octoxinol-40.

De preferência, o tensoativo ou detergente não iônico 25 está presente em uma concentração de pelo menos 0,0001%, ou pelo menos 0,0005%, ou pelo menos 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004% ou 0,005% (p/v). De preferência, a concentração é a mais baixa necessária para se conseguir a estabilidade desejada, contudo, pode ser de até 0,005%, 0,006%, 0,007%, 30 0,008%, 0,009%, 0,01% ou 0,02% (p/v). Muitíssimo de preferência, a composição compreende um polissorbato em uma concentração de 0,005% ± 0,003% (por exemplo, 0,002% a

0,008%). Esses ingredientes de composição, de preferência podem ser fornecidos nas seguintes quantidades:

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| N-acetilgalatosamina-4-sulfatase | 1-5 mg/mL ou 50 - 250 unidades/mL                                |
| Solução de cloreto de sódio      | 150 mM em uma bolsa IV, 50 - 250 cm <sup>3</sup> de volume total |
| Tampão de fosfato de sódio       | 10 - 100 mM, pH 5,8, de preferência 10 mM                        |
| Albumina humana, opcional        | 1 mg/mL  |
| Tween - 20 ou Tween - 80         | 0,001% - 0,005% (p/v)  |

Em uma concretização preferida, a ASB é formulada como 1 mg/mL em NaCl 150 mM . NaPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 5,8, Polissorbato 80 à 0,005%.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção apresenta 5 um método para produzir N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, em quantidades que permitam usar a enzima terapeuticamente. Em uma concretização ampla, o método compreende a etapa de transfecção um cADN que 10 codifique, no todo ou em parte, uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu mutante ou análogo biologicamente ativo, em uma célula adequada para a sua expressão. Em algumas concretizações, um cADN que codifique uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) completa é 15 usado, de preferência, uma N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) humana. Entretanto, em outras concretizações, pode ser usado um cADN que codifique um seu mutante ou análogo biologicamente ativo. Especificamente, uma ou mais substituições de aminocácidos podem ser feitas, 20 desde que se preserve ou intensifique a atividade biológica da enzima.

Em outras concretizações preferidas, usa-se um vetor de expressão para transferir o cADN para uma célula adequada ou linhagem de células para sua expressão. Em uma

concretização particularmente preferida, o transfectado para uma célula de Ovário de Hamster Chinês, tal como a linhagem de células CHO-K1. Ainda em outras concretizações preferidas, o procedimento de produção 5 comprehende as seguintes etapas: (a) cultivo de células transfectadas com ADN que codifica toda uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana ou um seu fragmento ou mutante biologicamente ativo, em um meio de cultivo adequado até uma densidade apropriada; (b) introdução das 10 células transfectadas em um biorreator, (c) suprimento de um meio de cultura adequado ao biorreator, (d) coleta do meio contendo a enzima recombinante, e (e) remoção, de maneira substancial, as células transfectadas do meio coletado.

15 Um meio adequado para se cultivar as células transfectadas é um meio JRH Excell 302, suplementado com L-glutamina, glicose e hipoxantina / timidina, opcionalmente com ou sem G418. Em um meio preferido, o meio JRH Excell 302 é adicionalmente suplementado com ácido fólico, serina 20 e asparagina, e não há G418 presente no meio. Usando-se esse meio preferido para cultivar as células, fornece-se uma precursora de rhASB de pureza mais elevada, comparado ao uso do meio suplementado com G418, mas, sem ácido fólico, serina e asparagina (ver trilha 2 da Figura 6).  
25 Prefere-se cultivar as células em um meio tal que se alcance uma densidade de células de cerca de  $1 \times 10^7$  células/mL, resultando em 10 - 40 mg/mL de enzima ativa. Além disso, é preferível cultivar as células transfectadas em um biorreator durante cerca de 5 a 15 dias, mais 30 preferivelmente, cerca de 9 dias. De preferência, as células transfectadas são cultivadas em um biorreator usando um processo baseado em perfusão com coletas continuando até 35 dias. Mais preferivelmente, as células

transflectadas são cultivadas em um biorreator usando um processo baseado em perfusão com coletas continuando até 45 dias. Ainda mais preferivelmente, as células transflectadas são cultivadas em um biorreator usando um processo baseado em perfusão com coletas continuando até 60 dias. Ainda muito mais preferivelmente, as células transflectadas são cultivadas em um biorreator usando um processo baseado em perfusão com coletas continuando até 90 dias.

De acordo com concretizações preferidas, as células transflectadas podem ser removidas, de maneira substancial, do sobrenadante do biorreator filtrando-as através de membranas sucessivas, tais como uma membrana de 10  $\mu\text{m}$ , seguida por uma membrana de 1  $\mu\text{m}$ , seguida por uma de 0,2  $\mu\text{m}$ . Qualquer meio de coleta remanescente pode ser descartado antes da filtração.

N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana recombinante pode ser produzida em células de Ovário de Hamster Chinês (Peters, et al., J. Biol. Chem. 265: 3374-3381). A sua assimilação é mediada por um receptor de manose-6-fosfato de elevada afinidade expresso na maioria, mas, não em todas, as células (Neufeld, et al., "The mucopolysaccharidoses", The Metabolic Basis of Inherited Disease, eds. Scriver, et al., New York: McGraw-Hill (1989), páginas 1565-1587). Uma vez ligada ao receptor de manose-6-fosfato, a enzima sofre endocitose através de pits revestidos e é transportada aos lisossomos. No pH dos lisossomos, a enzima está ativa e começa a remover os resíduos de sulfato do sulfato de dermatano acumulado. Nos fibroblastos de MPS VI acumulados, a eliminação de armazenamento é rápida e facilmente demonstrada dentro de 92 horas da exposição da enzima (Anson, et al., J. Clin. Invest. 99: 651-662 (1997)). A enzima recombinante pode ser

produzida em uma escala de fermentação de 110 L (volume de trabalho de aproximadamente 90 L), de acordo com um processo de acordo com o fluxograma delineado na Figura 1.

A enzima recombinante pode ser produzida usando-se o 5 método seguinte, conforme descrito na Tabela 1A-C.

**Tabela 1A: Processo de Cultivo de Células pelo Processo de Batelada Alimentada**

| Etapa  | Processo  | Testagem no Processo   |
|--|---|--|
| 1. Descongelamento do Banco de Células de Trabalho (WCB) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inocular as células descongeladas em um frasco T-75 com 25 mL de meio JRH Excell 302 suplementado com L-glutamina 4 mM, 4,5 g/L de glicose e 10 mg/L de hipoxantina / timidina; adicionalmente suplementado com ácido fólico, serina e asparagina (nenhum G418)</li> <li>Cultivar durante 3 dias para alcançar densidade de <math>1 \times 10^{10}</math> células</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |
| 3. Frasco Spinner de 250 mL                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Adicionar células a 175 mL de meio suplementado (sem G418)</li> <li>Cultivar durante 3 dias</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |
| 4. Frasco Spinner de 1 L                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Adicionar células a 800 mL de meio suplementado (sem G418)</li> <li>Cultivar 1 - 2 dias</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |
| 5. Frasco Spinner de 8 L                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Adicionar células a 4 L de meio suplementado (sem G418)</li> <li>Cultivar 1 - 2 dias</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |
| 6. 2 x Frasco Spinner de 8 L                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dividir o volume de trabalho em 2 Frascos Spinner de 8 L</li> <li>Adicionar células a 5,5 L de meio suplementado (sem G418) para cada Frasco Spinner de 8 L</li> <li>Cultivar 1 - 2 dias</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |
| 7. Inoculação de Biorreatore de 100 L                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Adicionar células a 7 mL de meio suplementado</li> <li>Cultivar 9 dias</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |
| 8. Produção  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Aproximadamente 9 dias de cultivo em biorreatore</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de células</li> <li>Viabilidade das células</li> </ul> |

|                            |  | • Atividade  |
|----------------------------|--|--|
| 9. Coleta de Sobre nadante | • O coletado é bombeado para bolsa de 100 L, refrigerado durante uma noite   |  |
| 10. Remoção de células     | • Células são removidas do meio coletado por filtração através de um cartucho de membrana de 10 $\mu\text{m}$ , seguido por cartuchos de 1 $\mu\text{m}$ e 0,2 $\mu\text{m}$ . Uma vez que as células tenham sido deixadas repousar durante uma noite, os 5 a 10% finais do meio coletado são descartados antes da filtração | Ponto de Liberação de QC<br>• Atividade<br>• Biocarga<br>• Endotoxina<br>• Micoplasma<br>• Advento <i>in vitro</i> . Agentes |

Em uma concretização, as células transfetadas são cultivadas em um processo de cultura de células, que é um processo baseado em perfusão, com coletas continuando até 5 35 ou mais dias, com uma taxa de coletas de aproximadamente 400 L por dia, a partir de um biorreator de 110 L. De preferência, a taxa de coleta é de aproximadamente 800 L por dia, a partir de um biorreator de 110 L. Um fluxograma de processo comparando o processo de cultura de células em 10 perfusão com o processo de cultura de células em batelada é mostrado na Tabela 1B. Comparações com o processo de batelada alimentada, assim como detalhes das mudanças específicas implementadas para o processo de cultura de células baseada em perfusão, estão resumidos na Tabela 1C.

15

**Tabela 1B: Processo de Cultura de Células - Comparação entre Processos de Batelada Alimentada e em Perfusão**

| Processo em Batelada                           | Processo em Perfusão         |
|--|------------------------------|
| 1 Frasco de Banco de Células de Trabalho (WCB) | 1 Frasco de WCB              |
| ↓  | ↓                            |
| Frasco T 75 cm <sup>3</sup>                    | Frasco T 75 cm <sup>3</sup>  |
| ↓  | ↓                            |
| Frasco Spinner de 250 mL                       | Frasco Spinner de 250 mL     |
| ↓  | ↓                            |
| 2 x Frasco Spinner de 250 mL                   | 2 x Frasco Spinner de 250 mL |
| ↓  | ↓                            |
| 2 x Frasco Spinner de 3L L                     | 2 x Frasco Spinner de 3 L    |
| ↓  | ↓                            |

| 2 x Frasco Spinner de 8L L   | 2 x Frasco Spinner de 8 L  |
|--|--|
| ↓  | ↓  |
| 2 x Biorreatores de 110L L<br>(volume de trabalho de 80-95 L)<br>Modo Batelada de 11 - 12 dias | 1 x Biorreator de 110 L<br>(volume de trabalho de 75 - 85 L)<br>Modo Batelada de 1 - 3 dias                |
| ↓  | ↓  |
| Coleção coletada armazenada em<br>bolsas de polietileno de 200 L                               | Duração de cultura de até 35 dias<br>↓<br>Coleção coletada armazenada em<br>bolsas de polietileno de 200 L |

**Tabela 1C: Descrição Sumária das Diferenças entre os  
Processos em Batelada Alimentada e em Perfusion**

| Etapa de Produção                | Descrição (Batelada)  | Descrição (Perfusão)   |
|----------------------------------|---|--|
| CULTURA DE CÉLULAS               | Uma batelada é o resultado de uma corrida de produção com dois biorreatores de 110 L  | Mudança: Uma batelada é o resultado de uma corrida de produção com um biorreator de 110 L  |
| Descongelamento de frasco de WCB | Um frasco para cada batelada de produção.<br>Testes: Viabilidade de células esperadas > 95%<br>Esperada $\geq 1 \times 10^6$ células recuperadas  | Mudança:<br>Viabilidade celular: > 90%<br>Viabilidade de > 90% em descongelamento provou obter corridas bem sucedidas e produto que atende às especificações |
| ↓                                |   |  |
| Frascos T 75 cm <sup>3</sup>     | Aproximadamente $5 \times 10^6$ células plaqueadas em um frasco.<br>Duração da etapa: $\approx$ 3 dias<br>Testes: Viabilidade de células esperada > 90%<br>Esperada $\geq 2 \times 10^7$ células recuperadas                                      | Nenhuma mudança  |
| ↓                                |   |  |
| Frasco Spinner de 250 mL         | Células provenientes do T75 são divididas em um frasco Spinner de 250 mL.<br>Duração da etapa: $\approx$ 2 dias<br>Testes: Viabilidade de células esperada > 90%<br>Esperada $\geq 2 \times 10^8$ células recuperadas                             | Nenhuma mudança  |
| ↓                                |   |  |
| 2 x Frasco Spinner de 250 mL     | Células provenientes de 1 x Frasco Spinner de 250 mL são divididas em dois Frascos Spinner de 250 mL.<br>Duração da etapa: $\approx$ 3 dias<br>Testes: Viabilidade de células esperada > 90%<br>Esperada $\geq 4 \times 10^8$ células recuperadas | Nenhuma mudança  |
| ↓                                |   |  |

|                                 |   |  |
|---------------------------------|---|--|
| 2 x Frasco Spinner de 3 L       | Células provenientes de 2 x Frasco Spinner de 250 mL são divididas em dois Frascos Spinner de 3 L.<br>Duração da etapa: ~ 4 dias<br>Testes: Viabilidade de células esperada > 90%<br>Esperada $\geq 4,8 \times 10^9$ células recuperadas  | Nenhuma mudança  |
| 2 x Frasco Spinner de 3 L       | Células provenientes de 2 x Frasco Spinner de 3 L são divididas em dois Frascos Spinner de 8 L.<br>Duração da etapa: ~ 2 dias<br>Testes: Viabilidade de células esperada > 90%<br>Esperada $\geq 1,6 \times 10^{10}$ células recuperadas  | Nenhuma mudança  |
| Inoculação de Frasco de Cultura | Inóculo de $\geq 0,8 \times 10^{10}$ células é adicionado a cada um dos dois biorreatores contendo 32 L de meio de cultura cada um. Cultura monitorada com sistema de controle com interface de PC  | Mudança:<br>Inóculo de $\geq 1,6 \times 10^{10}$ células adicionado a um biorreator contendo 64 L de meio de cultura. (reflete o uso de um biorreator versus dois).  |
| Produção                        | Crescimento: 3 dias de crescimento até que a cultura alcance uma densidade $> 3,2 \times 10^{10}$ células.<br>Divisão vertical: meio de cultura adicionado até o volume final de 95 L.<br>Coleta: Sobrenadante foi coletado no dia 11 ou quando a viabilidade celular caiu abaixo de 70%. O sobrenadante é filtrado e armazenado. | Mudanças: Crescimento / Transição / Coleta:<br>Quando a densidade de células alcança $> 8 \times 10^{10}$ células/mL, a perfusão é iniciada. A taxa de perfusão é gradualmente aumentada para 5 volumes de vaso por dia, com base nos níveis de glicose. Quando a densidade de células for $> 1,28 \times 10^{12}$ , o ajuste de pH é levado para 7,35. Uma vez que cessem os aumentos de taxa de perfusão, o nível de glicose é mantido por redução da densidade de células com uma sangria de células. O sobrenadante colhido é coletado e filtrado. |
| Finalização                     | A corrida é terminada na coleta.  | Mudança: A corrida é terminada depois de se alcançar 35 ou mais dias ou que a atividade caia abaixo de 2 mg/mL durante três dias consecutivos ou depois que sobrenadante colhido adequado seja coletado.   |

A preparação de inóculo para processo de aumento de escala é a mesma para os processos em batelada alimentada e em perfusão. Em uma concretização, a cultura de células rhASB é iniciada por descongelamento de um único frasco 5 proveniente do Banco de Células de Trabalho e por transferência de seu conteúdo (aproximadamente 1 mL) para aproximadamente 25 mL de meio EX-CELL 302 (modificado com L-glutamina, sem vermelho de fenol) em um frasco T de cultura de células com 75 cm<sup>2</sup>. Em cada etapa de expansão, a 10 cultura de células é incubada até que uma contagem de células viáveis de aproximadamente 0,8 x 10<sup>6</sup> células/mL seja alcançada. Cada etapa de expansão de células é monitorada com relação ao crescimento celular (densidade de células) e viabilidade (via exclusão de azul de tripano). 15 Todas as adições de meio EX-CELL 302 (modificado com L-glutamina, sem vermelho de fenol) e as transferências de células são realizadas assepticamente em uma capela de escoamento laminar. A cultura de células é expandida seqüencialmente a partir do frasco T com 75 cm<sup>2</sup> para um 20 frasco spinner de 250 mL, para dois frascos spinner de 250 mL, para dois frasco spinner de 3 L e, finalmente, para dois frascos spinner de 8 L. Todo o processo de aumento de escala dura aproximadamente 14 dias. Quando os dois frascos spinner de 8 L estiverem à uma densidade de pelo menos 1,0 25 x 10<sup>6</sup> células/mL, os frascos são usados para semear um biorreator de 110 L.

Prefere-se que cada operação de biorreator para a expressão ou produção ou manufatura de rhASB utilize um processo de cultura de células baseado em perfusão. De 30 preferência, o biorreator, usando o processo de perfusão, pode controlar as densidades de células tão altas quanto até 37 milhões de células por mL; comparando-se aos 4 - 5

milhões de células por mL usando-se o processo de batelada alimentada.

O processo baseado em perfusão corre durante mais tempo (35 dias) do que o processo de batelada alimentada 5 (11 - 12 dias) e produz um volume maior de fluido de cultura de células coletadas (aproximadamente 400 L/dia em uma taxa de perfusão de 5 volumes de vaso por dia) em comparação com o processo de batelada alimentada (190 L/corrida). De preferência, a coleta é realizada até 35 10 dias para uma coleta total de aproximadamente 8.400 L de sobrenadante.

As Células de Produção Final (EPC) são avaliadas com relação à estabilidade genética, à identidade, à esterilidade e contaminação por agente adventício por 15 diretriz de ICH. De preferência, resultados de EPC, obtidos a partir de uma corrida em biorreator de 35 dias de duração, AC60108, produzidos sob condições de cGMP, mostram nenhum crescimento ou resultados negativos ou nenhuma detecção da presença de bactérias e fungos, micoplasma, 20 contaminantes virais adventícios, vírus murinos, ou contaminantes ou partículas semelhantes.

Em um quarto aspecto, a presente invenção fornece uma linhagem de células transgênicas, que apresenta a capacidade de produzir N-acetilgalactosamina-4-sulfatase 25 (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, em quantidades que permitam usar a enzima terapeuticamente. Em concretizações preferidas, a presente invenção apresenta uma linhagem de células de Ovário de Hamster Chinês recombinante, tal como a linhagem 30 de células CHO-K1, que produz, de maneira confiável e estável, quantidades de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (ASB), que permitam usar a enzima terapeuticamente.

Especialmente preferida é a linhagem de células CHO-K1 designada por CSL4S-342. Em algumas concretizações preferidas, a linhagem de células contém um ou mais de um construto de expressão. Mais preferivelmente, a linhagem de células contém cerca de 10 ou mais cópias do construto de expressão. Em concretizações ainda mais preferidas, a linhagem de células expressa N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) recombinante em quantidades de pelo menos cerca de 20 - 80 ou 40 - 80 microgramas por  $10^7$  células por dia.

N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) humana recombinante (rhASB) pode ser produzida a partir de uma linhagem de células CHO-K1 (Ovário de Hamster Chinês) transfetada, estável, designada por CSL4S-342. A linhagem de células é descrita na literatura (Crawley, J. Clin. Invest. 99: 651-662 (1997)). Banco de Células Mestre (MCB) e Banco de Células de Trabalho (WBC) foram preparados em Tektagen, Inc. (Malvern, PA). Os bancos de células foram caracterizados por diretrizes recomendadas por ICH para uma linhagem de células de mamífero recombinante.

Em um quinto aspecto, a presente invenção fornece novos vetores adequados para produzir N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, em quantidades que permitam usar a enzima terapeuticamente.

Em um sexto aspecto, a presente invenção fornece nova N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo, produzida de acordo com os métodos da presente invenção e, por meio disso, presente em quantidades que permitem usar a enzima terapeuticamente. A atividade específica preferida da N-acetilgalatosamina-4-sulfatase (ASB) de acordo com a presente invenção é de cerca de 20 - 90 unidades, e mais

preferivelmente maior do que 50 unidades por miligrama de proteína. De preferência, a enzima tem um peso de glicosilado de cerca de 55 a 56 KDa, muitíssimo de preferência de 55,7 KDa. De preferência, a enzima tem um peso glicosilado de cerca de 63 a 68 KDa, muitíssimo de preferência de cerca de 64 a 66 KDa. A presente invenção também inclui fragmentos biologicamente ativos, incluindo moléculas truncadas, análogos e mutantes da N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana de ocorrência natural.

O cADN humano para N-acetilgalactosamina-4-sulfatase prevê uma proteína de 533 aminoácidos, com um peptídeo de sinal de 41 aminoácidos (Peters, et al., J. Biol. Chem. 265: 3374-3381). O peso molecular previsto é de cerca de 55,9 KDa depois de clivagem do peptídeo de sinal. A enzima recombinante tem um peso molecular aparente de 64 KDa em SDS-PAGE, devido a modificações de carboidratos. A sequência de proteína prevista contém seis potenciais sítios de modificação de oligossacarídeo ligados a N, dos quais quatro podem ser usados com base em uma massa média de 2.000 KDa e 8.000 KDa de diferença entre as massas prevista e aparente. Uma forma madura da proteína intracelular tem três peptídeos ligados por ligações de cistina. O maior peptídeo tem um peso molecular de 47 KDa; os outros dois têm um peso molecular de 6 e 7 KDa, respectivamente.

Uma descrição de um produto de droga, produzido e purificado de acordo com os métodos da presente invenção, é fornecida na Tabela 2.

Tabela 2: Especificações Preliminares de Produto de Droga

| Teste     | Procedimento            | Especificação               |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| Atividade | Ensaio de fluorescência | 20.000-120.000<br>mÚnidades |

| Virus Adventícios*                          | Ensaio In Vitro          | Passa   |
|---|--------------------------|---|
| Aparência                                   | Visual                   | Claro, solução a incolor a amarelo pálido                 |
| Endotoxina Bacteriana                       | LAL                      | ≤ 2 UE/mL   |
| Cloreto                                     | Absorção Atômica         | Valor Relatado  |
| Ensaio de Assimilação de fibroblasto de ASB | TBD                      | ≤ 40 nmol   |
| Micoplasma*                                 | Pontos a Considerar 1993 | Passa   |
| Particulados                                | USP                      | ≤ 600 / frasco de 25 µm<br>&<br>≤ 6.000 / frasco de 10 µm |
| pH  | USP                      | 5,5 - 6,8   |
| Fosfato                                     | Absorção Atômica         | Valor Relatado  |
| Concentração de Proteína                    | UV 280                   | 0,8 - 1,2 mg/mL   |
| Pureza                                      | SDS PAGE                 | 1 banda principal entre 65 - 70 KDa                       |
|   | RP-HPLC                  | > 95%   |
| Corante Azul Residual                       | TBD                      | Valor Relatado  |
| Cobre Residual                              | TBD                      | Valor Relatado  |
| Sódio                                       | Absorção Atômica         | Valor Relatado  |
| Atividade Específica                        | Cálculo                  | 40.000 - 80.000 mUnidades/mg                              |
| Esterilidade                                | 21 CFR 610               | Passa   |

\*Testado em sobrenadante coletado a partir de biorreator (depois da remoção de células por filtração).

Em um sétimo aspecto, a presente invenção apresenta um novo método para purificar N-acetilgalactosamina-4-5 sulfatase (ASB) ou um seu fragmento, mutante ou análogo biologicamente ativo. De acordo com uma primeira concretização, uma massa de células transfetada é cultivada e removida, deixando a enzima recombinante. Materiais exógenos normalmente devem ser separados a partir da massa bruta para evitar a deposição microbiológica nas colunas. De preferência, o meio de cultura contendo a enzima recombinante passa através de uma etapa de ultrafiltração e de diafiltração. Em um método, a solução

filtrada é passada através de uma coluna de cromatografia de DEAE-Sepharose, então, através de uma coluna de cromatografia de Blue-Sepharose, então através de uma coluna de cromatografia de Sepharose- $\text{Cu}^{2+}$  quelante, e, 5 então, através de uma coluna de cromatografia de Fenil-Sepharose. Uma tal cromatografia em coluna de quatro etapas, incluindo usar uma coluna de cromatografia de DEAE-Sepharose, de Blue-Sepharose, de  $\text{Cu}^{2+}$  Quelante-Sepharose e uma coluna de Fenil-Sepharose, de maneira seqüencial, 10 resulta em enzima recombinante especialmente altamente purificada. Os técnicos especializados no assunto apreciarão que uma ou mais etapas de cromatografia podem ser omitidas ou substituídas, ou que a ordem das etapas pode ser alterada dentro do escopo da presente invenção. Em 15 outras concretizações preferidas, o eluente da coluna de cromatografia final é ultrafiltrado / diafiltrado, e uma etapa apropriada é realizada para remover quaisquer vírus remanescentes. Finalmente, etapas esterilizantes apropriadas podem ser realizadas conforme desejado. A 20 enzima recombinante pode ser purificada de acordo com um processo delineado na Figura 2. A qualidade da enzima recombinante é chave para os pacientes. A rhASB produzida por este método é substancialmente pura (> 95%).

Em uma concretização preferida, a etapa de 25 ultrafiltração / diafiltração é realizada com uma solução de fosfato de sódio de cerca de 10 mM e com uma solução de cloreto de sódio de cerca de 100 mM, em um pH de cerca de 7,3. Em outra concretização, a etapa de cromatografia em DEAE-Sepharose é realizada em um pH de cerca de 7,3, sendo 30 que a solução eluída é ajustada com um tampão adequado, de preferência, um tampão de cloreto de sódio e de fosfato de sódio. Em concretizações adicionais preferidas, a etapa de cromatografia em Blue-Sepharose é realizada em um pH de

cerca de 5,5, sendo que a solução eluída é ajustada com um tampão apropriado, de preferência, um tampão de cloreto de sódio e de acetato de sódio. Também em concretizações preferidas, a etapa de cromatografia em  $Cu^{2+}$  Quelante-5 Sepharose é realizada com um tampão de eluição incluindo cloreto de sódio e acetato de sódio. Em concretizações especialmente preferidas, realiza-se uma segunda etapa de ultrafiltração / diafiltração sobre o eluado das corridas de cromatografia, sendo que a enzima recombinante é 10 concentrada para uma concentração de cerca de 1 mg/mL, em um tampão de formulação, tal como um tampão de cloreto de sódio e de fosfato de sódio, para um pH de cerca de 5,5 a 6,0, muitíssimo de preferência, para um pH de 5,8. Tampão de fosfato é um tampão preferido usado no processo porque o 15 tampão de fosfato evita a degradação crítica e melhora a estabilidade da enzima.

Uma descrição mais detalhada de métodos de purificação particularmente preferidos, dentro do escopo da presente invenção, é mostrada na Tabela 3.

20

**Tabela 3: Panorama do Processo de Purificação**

| Etapa                              | Processo  |
|------------------------------------|---|
| 1. UF/DF                           | Fluido de coleta filtrado (HF) é concentrado dez vezes e, então, diafiltrado com 5 volumes de fosfato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3, usando um sistema de filtração de escoamento tangencial (TFF)<br>↓   |
| 2. DEAE- Sepharose FF (percolação) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tampão de pré-lavagem 1: NaOH 0,1 N</li> <li>Tampão de pré-lavagem 2: NaPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,3</li> <li>Tampão de equilíbrio: NaCl 100 mM, NaPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,3</li> <li>Carga: Produto da etapa 1</li> <li>Tampão de lavagem: NaCl 100 mM, NaPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,3</li> <li>Tampão de esgotamento: NaCl 1 M, NaPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,3</li> <li>Tampão de sanitização: NaOH 0,5 N</li> <li>Tampão de armazenamento: NaOH 0,1 N</li> </ul><br>↓ |
| 3. Blue- Sepharose FF              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tampão de pré-lavagem 1: NaOH 0,1 N</li> <li>Tampão de pré-lavagem 2: água</li> <li>Tampão de pré-lavagem 3: NaAc 1 M, pH 5,5</li> <li>Tampão de equilíbrio: NaCl 150 mM, NaAc 20 mM, pH 5,5</li> <li>Carga: Percolado de DEAE</li> <li>Tampão de lavagem: NaCl 150 mM, NaAc 20 mM, pH 5,5</li> </ul>  |

|   |  |
|---|--|
|   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampão de eluição: NaCl 500 mM, NaAc 20 mM, pH 5,5</li> <li>• Tampão de regeneração: NaCl 1 M, NaAc 20 mM, pH 5,5</li> <li>• Tampão de sanitização: NaOH 0,1 N, 0,5 - 2 horas</li> <li>• Tampão de armazenamento: NaCl 500 mM, NaAc 20 mM pH 5,5, ETOH 20%</li> </ul>   |
|   | ↓  |
| 4. Cu <sup>2+</sup> Quelante-Sepharose FF | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampão de pré-lavagem 1: NaOH 0,1 N</li> <li>• Tampão de pré-lavagem 2: água</li> <li>• Tampão de carga: Sulfato de cobre 0,1 M</li> <li>• Tampão de equilíbrio: NaAc 20 mM, NaCl 0,5 M, glicerol à 10%, pH 6,0</li> <li>• Carga: Eluato de Blue-Sepharose</li> <li>• Tampão de lavagem 1: NaAc 20 mM, NaCl 0,5 M, glicerol à 10%, pH 6,0</li> <li>• Tampão de lavagem 2: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, glicerol à 10%, pH 4,0</li> <li>• Tampão de lavagem 3: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, glicerol à 10%, pH 3,8</li> <li>• Tampão de eluição: NaAc 20 mM, NaCl 1 M, glicerol à 10%, pH 3,6</li> <li>• Tampão de esgotamento: EDTA 50 mM, NaCl 1 M</li> <li>• Tampão de sanitização: NaOH 0,5 N, 0,5 - 2 horas</li> <li>• Tampão de armazenamento: NaOH 0,1 N</li> </ul> |
|   | ↓  |
| 5. Fenil- Sepharose HP                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampão de pré-lavagem 1: NaOH 0,1 N</li> <li>• Tampão de pré-lavagem 2: água</li> <li>• Tampão de equilíbrio: NaCl 3 M, NaAc 20 mM pH 4,5</li> <li>• Carga: Eluato de Cu<sup>2+</sup> Quelante-Sepharose</li> <li>• Tampão de lavagem 1: NaAc 20 mM, NaCl 3,0 M, pH 4,5</li> <li>• Tampão de lavagem 2: NaAc 20 mM, NaCl 1,5 M, pH 4,5</li> <li>• Tampão de lavagem 3: NaAc 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 4,5</li> <li>• Tampão de esgotamento: NaCl 0 M, NaAc 20 mM, pH 4,5</li> <li>• Tampão de sanitização: NaOH 0,5 N</li> <li>• Tampão de armazenamento: NaOH 0,1 N</li> </ul>   |
|   | ↓  |
| 6. UF/DF                                  | A rhASB purificada é concentrada e diafiltrada para uma concentração final de 1,5 mg/mL, em tampão de formulação (NaCl 150 mM, NaPO <sub>4</sub> 10 mM, pH 5,8)  |
|   | ↓  |
| 7. Formulação (se necessário)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diluir com tampão de formulação adicional</li> </ul>  |
|   | ↓  |
| 8. Redução Viral / Filtração Estéril      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtração em 0,2 μm para um recipiente estéril</li> </ul>   |
|   | ↓  |
| 9. Enfrascamento                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produto filtrado para frascos de vidro do Tipo 1, de 5 cm<sup>3</sup>, tampados manualmente, lacrado e rotulado.</li> </ul>   |

A substância de droga bruta formulada pode ser esterilizada através de um filtro de 0,04 micra, ou, de preferência, de um filtro de 2 micra, em uma capela de 5 escoamento laminar de classe 100 para frascos de vidro do Tipo 1. Os frascos podem ser enchidos até um volume final de cerca de 5 mL, usando-se uma máquina de enchimento de

líquido semi-automática. Os frascos podem ser, então, tampados, selados e rotulados manualmente.

Um método mais preferido para purificar uma precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase compreende: (a) obter 5 um fluido contendo precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase; (b) reduzir a atividade proteolítica de uma protease no fluido capaz de clivar a precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase, sendo que a redução não danifica a precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase; 10 (c) colocar em contato o fluido com uma resina de cromatografia de afinidade com corante azul Cibracon; (d) colocar em contato o fluido com uma resina de cromatografia de cobre-quelante; (e) colocar em contato o fluido com uma resina de cromatografia de afinidade hidrofóbica com 15 fenila; e (f) recuperar a precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase. De preferência, as etapas (c), (d) e (e) são realizadas seqüencialmente. Esse método exige não mais do que três etapas ou colunas de cromatografia. A fim de se obter a precursora de N- 20 acetilgalatosamina-4-sulfatase altamente purificado, não são exigidas etapas ou colunas de cromatografia adicionais. Esse método não compreende o contato do fluido com uma resina de DEAE-Sepharose. A precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase recuperado tem uma pureza 25 de pelo menos igual a ou maior do que 99%. O rendimento de recuperação global pode ser de pelo menos cerca de 40 - 60%.

De preferência, a obtenção do fluido contendo a precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase compreende 30 o cultivo de uma cultura de células transformadas com um gene que codifica a N-acetilgalatosamina-4-sulfatase; de preferência, o gene codifica N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana. De preferência, as células são células de

mamíferos. Mais preferivelmente, as células de mamíferos são células de Ovário de Hamster Chinês. A etapa de obtenção pode compreender adicionalmente a coleta do fluido da cultura de células. A etapa de obtenção pode compreender 5 adicionalmente a concentração do fluido em cerca de 20 x.

Uma característica desse método é uma separação precoce de atividade de protease e a precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase. Essa separação pode compreender (1) a redução, inibição ou inativação da 10 atividade de protease, ou (2) a separação física da(s) protease(s) da precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase. De preferência, essa separação ocorre tão cedo quanto possível durante o processo de purificação. A 15 finalidade é manter em um mínimo o número de moléculas do precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase sendo clivadas na forma madura ou processada e/ou em outra(s) forma(s) degradada(s). A forma precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase é a forma preferida, em oposição à forma madura ou processada, porque ela é mais 20 prontamente assimilada no tecido alvo e para subsequente direcionamento ao lisossoma. Quanto mais cedo ou prematuramente a atividade de protease for separada da precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase, menor será 25 o número de moléculas da forma precursora que seriam clivadas na forma madura ou processada.

A atividade da protease é reduzida ou inibida por ajuste do fluido para um valor de pH entre cerca de 4,8 e 8,0. De preferência, o valor de pH está entre cerca de 4,8 e 5,5. Mais preferivelmente, o valor de pH está entre cerca 30 de 4,8 e 5,2. A atividade de protease específica que se deseja reduzir é a atividade de protease que cliva, de maneira específica, a forma precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase nas formas madura ou

processada. A atividade de protease é encontrada em uma ou mais proteases de cisteína. Uma protease de cisteína que cliva de maneira específica a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase é a catepsina L. Essa 5 catepsina L tem um peso molecular de cerca de 36 KDa em sua forma inativa, que é convertida em suas formas ativas de tamanho de 21 - 29 KDa, quando de exposição a pH de menos do que 5,0 (ver a Figura 9C). O pH pode ser ajustado para qualquer valor, por meio do que a(s) protease(s) não é(são) 10 convertida(s) de sua(s) forma(s) inativa(s) em sua(s) forma(s) ativa(s) e a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase desejada, ou sua atividade biológica, não seja danificada ou não seja irreversivelmente danificada.

De preferência, a etapa (c) compreende a passagem do 15 fluido através de uma coluna de cromatografia de afinidade com corante azul de Cibracon. Mais preferivelmente, a coluna de cromatografia de afinidade com corante azul de Cibracon é uma coluna Blue-Sepharose 6 "Fast Flow". De preferência, a etapa (d) compreende a passagem do fluido 20 através de uma coluna de cromatografia de cobre quelante. Mais preferivelmente, a coluna de cromatografia de cobre quelante é uma coluna Cobre Quelante-Sepharose "Fast Flow". De preferência, a etapa (e) compreende a passagem do fluido 25 através de uma coluna de cromatografia de afinidade hidrofóbica com fenil. Mais preferivelmente, a coluna de cromatografia de afinidade hidrofóbica com fenil é uma coluna Fenil-Sepharose 6 "Fast Flow High Sub". De preferência, a seqüência temporal das etapas (c), (d) e (e) são as etapas (c), etapa (d) e etapa (e).

30 A etapa de recuperação pode compreender ultrafiltração e/ou diafiltração do fluido. A recuperação pode compreender a filtração do fluido para remover ADN e/ou filtração do fluido para remover vírus. A filtração, para remover vírus,

compreende a passagem do fluido através de filtro de 0,02  $\mu\text{m}$ .

Esse método também pode ser usado para purificar uma N-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou um seu fragmento, 5 análogo ou mutante biologicamente ativo.

A pureza de rhASB é medida ou determinada usando-se cromatografia líquida de alta performance de fase reversa ("RP-HPLC"), que separa proteínas com base em diferenças de hidrofobicidade. Esse ensaio usa uma coluna C4 (Phenomenex 10 Jupiter) como a fase estacionária, e um gradiente de água : acetonitrila, como a fase móvel. As amostras de proteína são inicialmente injetadas na coluna em água; sob essas condições, todas as proteínas ligar-se-ão à coluna. Uma concentração gradualmente crescente de acetonitrila é, 15 então, infundida através da coluna. Esse gradiente de acetonitrila aumenta a hidrofobicidade da fase móvel, até o ponto em que as proteínas individuais se tornem solúveis na fase móvel e se eluam da coluna. Esses tempos de eluição são reproduutíveis de maneira exata para cada proteína 20 individual em uma mistura. As proteínas são detectadas como pico em um cromatograma por absorbância de ultravioleta em 210 nm. As áreas de cada pico são calculadas, e a pureza da amostra pode ser calculada como a razão da área do pico de rhASB em relação à área total de todos os picos no 25 cromatograma. RP-HPLC é um método reproduutível, de elevada resolução, comprovado, de determinação da pureza de rhASB.

Estudos antes desse pedido indicam que a pureza de ASB foi determinada por realização de um ELISA proteína de impureza. Esse método de uso de ELISA de proteína de 30 impureza (os detalhes do qual não são revelados) provavelmente usa anticorpos originados contra uma mistura de potenciais proteínas de impurezas de células de hospedeiro. O ELISA provavelmente poderia ser realizado

usando-se uma curva padrão da mesma mistura de potenciais proteínas de impureza usadas para gerar os anticorpos. Amostras de teste seriam provavelmente quantificadas com relação aos níveis de impureza, relativos a essa mistura 5 padrão. Esses testes são ferramentas valiosas na purificação de proteínas, porém, são menos exatos do que RP\_HPLC para a determinação da pureza de produto, pelas seguintes razões:

(1) No teste de RP-HPLC, as proporções de rhASB e de 10 impurezas são, ambas, determinadas pela mesma medição (absorbância de UV). No ELISA, a concentração de impurezas é determinada por ligação a anticorpos, enquanto que o teor de proteínas alvo é determinado por outro método de teste (usualmente, absorbância de UV ou Bradford). O valor de 15 "pureza percentual" deve ser calculado como a razão de duas quantidades com as mesmas unidades, experimentalmente determinadas pelo mesmo método.

(2) Para o ELISA funcionar bem, a amostra detectada 20 pelo anticorpo deve ter a mesma composição de proteína que o padrão. Isso é muito improvável de ser o caso em um teste ELISA para impureza de proteína. O padrão de teste para esse tipo de teste seria uma mistura de muitas proteínas individuais, contra as quais os anticorpos foram gerados. Entretanto, somente um pequeno subconjunto de proteínas de 25 impureza devem estar presentes no produto de rhASB purificado. Portanto, o reagente de anticorpos estará, agora, detectando uma mistura diferente de proteínas, e a resposta versus o padrão provavelmente será algo não linear. Quando isso ocorre, o teste fornece um valor 30 líquido diferente para cada diluição de amostra, assim, não se deve saber qual diluição (se houver), está dando o valor correto.

(3) Além disso, nem todas as impurezas potenciais de proteínas são imunogênicas para o mesmo grau em animais, tais como coelhos, usados para gerar os anticorpos. Portanto, o nível de impurezas determinado por ELISA somente pode refletir um subconjunto das impurezas presentes nos produtos purificados. É inteiramente possível se ter uma ou mais impurezas principais no produto que sejam totalmente indetectáveis. Em contraste, RP-HPLC detecta todas as proteínas porque a absorbância de UV é uma propriedade universal de moléculas de proteína.

(4) Finalmente, existem dois tipos de impurezas em um produto de droga purificado: impurezas não relacionadas ao produto (proteínas de células de hospedeiro conforme discutido acima) e impurezas relacionadas ao produto (produtos de degradação incluindo formas processadas e agregados). As últimas não podem ser detectadas pelo teste de ELISA de impurezas, mas, podem ser prontamente detectadas por RP-HPLC.

Portanto, números reais obtidos a partir do teste de ELISA de impureza de proteínas são abertos ao questionamento, e RP-HPLC são baseados em uma base mais firme.

Além disso, a análise por SDS-PAGE permite a detecção tanto de impurezas de células de hospedeiro quanto de formas processadas ou degradadas do produto de proteína de droga desejada. Quando usadas em conjunção com Western-blot, impurezas não relacionadas ao produto a partir de contaminantes de células de hospedeiro podem ser diferenciadas das impurezas relacionadas ao produto. Finalmente, SEC-HPLC permite um nível de quantificação de impurezas relacionadas ao produto porque ela pode detectar impurezas de diferentes pesos moleculares, incluindo formas processadas ou degradadas de pesos moleculares mais baixos

da proteína, assim como monômeros, dímeros e outros multímeros.

Uma concretização desse método de purificação está retratada na Tabela 4.

5

**Tabela 4: Método de Purificação**

| Etapa   | Processo  |
|---|---|
| Filtração de Coleta   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Filtração através de filtros de clarificação, filtros de 0,45 <math>\mu\text{m}</math> e, finalmente, filtro de 0,2 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>Os filtrados de amostras coletivas coletadas são armazenados em bolsas de polipropileno</li> </ul>   |
| Concentração de UF  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Equilíbrio e descarga: fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3</li> <li>Carga: fluido coletado filtrado</li> <li>Concentração: concentração para 20 x</li> <li>Filtração: filtrar o produto diluído através de um filtro de 0,2 <math>\mu\text{m}</math> para um recipiente de armazenamento</li> </ul>  |
| Ajuste de pH e filtração  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ajuste de pH: adicionar ácido acético glacial à 10% às amostras coletivas concentradas de 20 x para um pH final igual a ou menor do que cerca de 7,3; de preferência, o pH é de cerca de 4,0 a 7,3; mais preferivelmente, o pH é de cerca de 4,5 a 5,5; ainda mais preferivelmente, o pH é de cerca de 5,0</li> <li>Carga: amostras coletivas concentradas de 20 x</li> <li>Enxágüe: água para injeção (WFI)</li> <li>Filtração através de filtros de clarificação e de filtro de 0,2 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>Descarga: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 120 mM, pH 5,0</li> <li>O rendimento de recuperação pode ser de pelo menos cerca de 83%</li> </ul>  |
| Coluna de cromatografia de afinidade de corante azul Cibracon (Blue-Sepharose 6 FF) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>Lavagem: água para injeção (WFI)</li> <li>Equalização: fosfato de sódio 10 mM, o pH é menor do que cerca de 6,5; de preferência, o pH é menor do que cerca de 5,0 a 6,5; mais preferivelmente, o pH é de cerca de 6,45</li> <li>Carga: concentrados de 20 x com pH ajustado e filtrados</li> <li>Lavagem: fosfato de sódio 10 mM, pH 6,45</li> <li>Eluição: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 125 mM, pH 6,45</li> <li>Regeneração: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 6,45</li> <li>Sanitização: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>Lavagem 1: água para injeção (WFI)</li> <li>Lavagem 2: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 6,45</li> <li>Armazenamento: etanol à 20%</li> <li>O rendimento de recuperação pode ser de pelo menos 84%</li> </ul> |
| Coluna de cromatografia de cobre quelante (Sepharose FF Quelante) (Cobre.CC. -)     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>Lavagem: água para injeção (WFI)</li> <li>Tampão de carga: sulfato cíprico 0,1 M</li> <li>Equalização: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, o pH é menor do que cerca de 6,0; de preferência, o pH é de cerca de 3,6 a 5,5; mais preferivelmente, o pH é de cerca de 5,5</li> <li>Carga: ajustar o teor de glicerol dos eluatos azuis</li> </ul>   |

|  |  |
|--|--|
| Cobre-quelante)  | <p>para 10% por adição de acetato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 2,0 M, glicerol à 50%, pH 5,0</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem 1: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 5,5</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 3,9</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 3,6</li> <li>• Eluato mantido durante 30 - 120 minutos antes do ajuste para pH 4,5 com NaOH 0,5 M</li> <li>• Regeneração: EDTA 50 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 8,0</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 M</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 M</li> <li>• O rendimento de recuperação pode ser de pelo menos cerca de 86%</li> </ul>  |
| Coluna de cromatografia de afinidade hidrofóbica com fenil (Fenil-Sepharose 6 FF High Sub) (Phenyl, Phenyl High Sub) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: água para injeção (WFI)</li> <li>• Equalização: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 2,0 M, o pH é de cerca de 4,5 a 7,1; de preferência, o pH é de cerca 4,5</li> <li>• Carga: ajustar o teor de cloreto de sódio do eluato de cobre para 2 M, por adição de acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 5 M, pH 4,5</li> <li>• Lavagem 1: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 7,1</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 4,5</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 250 mM, pH 4,5</li> <li>• Regeneração: acetato de sódio 20 mM, pH 4,5</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 N</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• O rendimento de recuperação pode ser de pelo menos cerca de 88%</li> </ul> |
| UF/DF, Filtração de ADN, Filtração Viral, Formulação   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equalização: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> <li>• Concentração: concentração para NMT 1,5 mg/mL</li> <li>• Diafiltração: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> <li>• Filtração de ADN: produto filtrado através de um filtro de ADN</li> <li>• Filtração viral / diluição: produto filtrado através de um filtro de 0,02 µm e diluído para 1,0 mg/mL</li> <li>• Formulação: Polissorbato 80 em uma concentração de 50 µg/mL é adicionado</li> <li>• Filtração: filtrar o produto diluído através de um filtro de 0,2 µm para recipiente de armazenamento</li> </ul>  |

Os componentes do produto da droga assim obtido são mostrados na Tabela 5. Os componentes da composição de produto da droga dentro do escopo da presente invenção são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 5: Componente de Produto de Droga**

| Componente | Descrição |
|------------|-----------|
|------------|-----------|

|                   |  |
|-------------------|--|
| Ingrediente ativo | N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana recombinante <sup>7,8</sup>  |
| Excipientes       | Fosfato de sódio, monobásico, 1 H <sub>2</sub> O<br>Fosfato de sódio, dibásico, 7 H <sub>2</sub> O<br>Cloreto de sódio         |
| Recipiente        | Frasco de vidro claro, de 5 mL, Kimble Glass, Tipo I,<br>de silicato de boro<br>West Pharmaceuticals, rolha Grey S-127 4432150 |

**Tabela 6: Composição de Produto de Droga**

| Componente                                       | Quantidade |
|--|------------|
| rhASB  | 1 mg/mL    |
| Fosfato de sódio, monobásico, 1 H <sub>2</sub> O | 9 mM       |
| Fosfato de sódio, dibásico, 7 H <sub>2</sub> O   | 1 mM       |
| Cloreto de sódio                                 | 150 mM     |

Tendo-se descrito a invenção, os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar o objeto da invenção por meio 5 de ilustração, não por meio de limitação.

#### **EXEMPLO 1**

#### **Avaliação Clínica com N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana recombinante**

##### **Sumário**

10 A indicação para N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana recombinante (rhASB) é o tratamento de MPS VI, também conhecida como Síndrome de Maroteaux-Lamy. Propõe-se um programa de desenvolvimento clínico para rhASB consistindo em um teste clínico de rótulo aberto inicial, 15 que fornecerá uma avaliação de infusões semanais da enzima com relação à segurança, à farmacocinética e à resposta inicial de estados terminais clínicos substitutos e definidos. O teste será conduzido durante um mínimo de três meses, para coletar informações de segurança suficientes 20 com relação a 5 pacientes avaliáveis. Nesse momento, se a dose inicial de 1 mg/Kg não produzir uma redução razoável do excesso urinário de glicosaminoglicanos ou produzir ou não produzir um benefício clínico direto significativo, a

dose será dobrada e mantida durante um adicional de três meses para se estabelecer a segurança e para se avaliar eficácia adicional.

### **Objetivos**

5 O objetivo primeiro é demonstrar a segurança de uma infusão semanal de rhASB em pacientes com MPS VI durante um período mínimo de três meses. Medidas de segurança incluirão eventos adversos, resposta imune e reações alérgicas (ativação de complemento, formação de anticorpos 10 com relação à enzima recombinante). O completo painel químico clínico (funções renal e hepática), urinálise e CBC com diferencial.

Um objetivo secundário é avaliar a eficácia por monitoração de mudanças em vários parâmetros conhecidos 15 pelos afetados por MPS VI. Esses incluem um teste de caminhada de seis minutos (como uma medida de tolerância ao exercício), avaliação de função pulmonar completa (PFT), redução dos níveis de glicosaminoglicanos urinários e hepatomegalia (como medições de armazenamento de GAG renal 20 e hepática), velocidade de crescimento, amplitude do movimento de junta, Questionário de Avaliação da Saúde Infantil (CHAQ), acuidade visual, função cardíaca, estudos do sono e duas diferentes avaliações globais; uma realizada pelo investigador, uma realizada pelo paciente/assistente. 25 Um segundo objetivo secundário é determinar os parâmetros farmacocinéticos de droga infundida na circulação, e a distribuição geral e a meia-vida de enzima intracelular usando leucócitos e tecido bucal como fontes de tecido. Antecipa-se que essas medições ajudarão a relatar a dose 30 com relação à resposta clínica, com base nos níveis de enzima entregues aos lisossomos das células.

### **Métodos**

Conduzir-se-á um estudo de rótulo aberto, de centro único, para demonstrar segurança e para avaliar parâmetros clínicos de tratamento com rhASB em pacientes com MPS VI. Os pacientes serão admitidos para uma avaliação de linha de 5 base de duas semanas, que incluirá um histórico médico e exame físico, testagem psicológica, testagem de resistência física (de rotina), um conjunto padrão de testes clínicos de laboratório (CBC, Painel 20, CH50, UA), uma varredura MRI ou CAT do corpo (determinação volumétrica do fígado e 10 do baço, avaliação óssea e da medula óssea, e tamanho dos nódulos linfáticos e tonsilar), uma avaliação cardiológica (ecocardiograma, EKG, CXR), uma avaliação das vias aéreas (testes de função pulmonar), um estudo do sono para avaliar eventos obstrutivos durante o sono, uma análise de 15 restrição das juntas (a amplitude de movimento será medida nos joelhos e nas juntas interfalangeanas), um LP com pressão de CNS, e estudos bioquímicos (atividade de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase bucal em duas ocasiões, atividade de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase de 20 leucócitos em duas ocasiões, GAG urinário em três ocasiões, geração de soro com relação a ELISA e anticorpos anti-rhASB e urina de 24 horas com relação à eliminação de creatinina). Além das avaliações acima, cada paciente será fotografado e filmado realizando alguns movimentos físicos, 25 tais como tentando elevar suas mãos sobre sua cabeça e caminhando. Os pacientes serão titulados com anti-histamínicos, de modo que o pré-tratamento com esses agentes possa ser efetivamente empregado antes da infusão da enzima. A dose humana proposta de 1 mg/Kg (50 U/Kg) será 30 administrada semanalmente por infusão i.v. durante 4 horas. O paciente permanecerá no hospital nas duas primeiras semanas, seguindo-se por curtas estadias durante as próximas quatro semanas. O tratamento durante as seis

semanas finais será conduzido em uma instalação proxima à residência do paciente. Os pacientes retornarão ao hospital para uma completa avaliação em três meses. Se a elevação da dose para 2 mg/Kg for necessária, os pacientes seguirão o 5 mesmo programa delineado acima para as primeiras doze semanas. Sob cada cenário, também ocorrerá uma completa avaliação em 6 semanas do momento da entrada no teste. A segurança será monitorada ao longo de todo o teste. Os pacientes que completarem o teste continuarão em terapia 10 seguindo um protocolo estendido durante tanto tempo quanto as condições de segurança e de eficácia o garantam até a aprovação de BLA.

#### **Número de Pacientes e Taxa de Arrolamento**

Um único paciente será arrolado no inicio do 15 tratamento, com dois pacientes adicionais um mês depois, e dois pacientes mais duas semanas mais tarde, exceto quaisquer complicações imprevistas relacionadas ao tratamento. Pacientes adicionais serão admitidos se qualquer dos pacientes arrolados se tornar criticamente 20 doente ou se uma criança estiver necessitando de um procedimento clínico agudo para condições nocivas ou que ameacem a vida.

#### **Diagnose e Critérios de Inclusão/Exclusão**

O paciente pode ser homem ou mulher, com cinco anos de 25 idade ou mais com uma diagnose documentada de MPS VI, confirmada por sinais e sintomas clinicos mensuráveis de MPS VI, e suportados por um nível de atividade de enzima ASB em fibroblastos ou leucócitos diminuído. Os pacientes mulheres com potencial de engravidar têm que ter um teste 30 de gravidez negativo ( $\beta$ -hCG urinário) logo antes de cada dosagem e têm que ser aconselhadas a usar um método de contracepção medicamente aceito ao longo de todo o estudo. Um paciente será excluído desse estudo se o paciente tiver

previamente sofrido transplante de medula óssea; se estiver grávida ou amamentando; se tiver recebido uma droga investigacional dentro de 30 dias antes do arrolamento no estudo; ou se tiver uma condição médica, doença 5 intercorrente séria ou outra circunstância extenuante, que possa diminuir de maneira significativa o cumprimento do estudo.

**Dose, Rota e Regime**

Os pacientes receberão rhASB em uma dose de 1 mg/Kg 10 (cerca de 50 U/Kg) durante os primeiros três meses do estudo. No caso de os GAGs urinários excessivos não diminuírem de uma quantidade razoável e de nenhum benefício clínico ser observado, a dose será dobrada. O aumento da dose ocorrerá somente depois que todos os 5 pacientes 15 tiverem sofrido 3 meses de terapia. Essa forma de dosagem de rhASB será administrada intravenosamente durante aproximadamente um período de quatro horas, uma vez por semana, durante um mínimo de 12 semanas consecutivas. Um cateter intravenoso periférico será colocado na veia 20 cefálica ou noutra veia apropriada e uma infusão de salina começará em 30 cm<sup>3</sup>/h. O paciente será pré-medicado com até 1,25 mg/Kg de difenil-hidramina i.v., com base nos experimentos de titulação completados antes do teste. rhASB 25 será diluída em 100 cm<sup>3</sup> de salina normal suplementada com 1 mg/mL de albumina humana. A enzima diluída será infundida em 1 mg/mL (cerca de 50 unidades por Kg) durante um período de 4 horas com monitoração de oxímetro de pulso e cárdo-respiratória. Os pacientes serão monitorados clinicamente, assim como com relação a qualquer reação adversa à infusão. 30 Se quaisquer sintomas incomuns forem observados, incluindo, mas, não estando limitados a, mal-estar, dificuldade de respirar, hipoxemia, hipotensão, taquicardia, náusea, calafrios, febre e dor abdominal, a infusão será

interrompida imediatamente. Com base nos sinais e sintomas clínicos, uma dose adicional de difenil-hidramina, máscara de oxigênio, um bolo de fluidos i.v. ou outras intervenções clínicas apropriadas, tais como tratamento com esteróides, 5 podem ser administrados. Se ocorrer uma reação aguda, uma avaliação com relação ao consumo de complemento no soro será testada. Um segundo sítio i.v. será usado para a amostragem necessária à análise farmacocinética.

#### **Pacientes Avaliáveis**

10 Os dados a partir de qualquer dado paciente serão considerados avaliáveis tanto quanto não mais do que duas infusões não seqüenciais sejam perdidas durante 12 semanas de terapia. As avaliações inicial, de ponto médio e final têm que ser completadas.

#### **15 Segurança**

A terapia com enzima será determinada como sendo segura se não ocorrerem quaisquer reações agudas significativas, que não possam ser evitadas por alteração da taxa de administração da enzima, ou uso agudo de anti-20 histamínicos ou de esteróides. A administração de longo tempo da enzima será determinada como sendo segura se não forem observadas anormalidades significativas nos exames clínicos, exames de laboratório clínicos, ou em outros estudos apropriados. A presença de anticorpos ou ativação 25 de complemento não serão, elas mesmas, consideradas inseguras, mas, tais anticorpos demandarão o monitoramento por ELISA, e por avaliações clínicas de possível doença complexa imune.

#### **Eficácia**

30 Uma finalidade desse estudo é avaliar estados terminais potenciais para o projeto de um teste crucial. Melhoras nos estados clínicos terminais e substitutos são esperados como um resultado de entrega de enzima e remoção

de armazenamento de glicosaminoglicano do corpo. O aumento de dose será realizado se os níveis médios de glicosaminoglicanos urinários em excesso não forem reduzidos de uma quantidade razoável durante três meses e 5 se nenhum benefício clínico significativo for observado em três meses. Aperfeiçoamentos são esperados como sendo comparáveis àqueles observados no teste clínico de MPS I recentemente completado e devem incluir índice de vias aéreas aperfeiçoado ou resolução de apnéia do sono, 10 mobilidade de juntas aperfeiçoada e resistência física aumentada.

#### **EXEMPLO 2**

Uma compilação abrangente das informações disponíveis para o gato com MPS VI e os estudos relevantes de 15 farmacologia e de toxicologia são apresentados a seguir. A terapia de reposição de enzima se estabeleceu como um tratamento promissor para uma variedade de distúrbios metabólicos hereditários, tais como Doença de Gaucher, Doença de Fabry e Mucopolissacaridose I. Em alguns desses 20 distúrbios, um modelo animal natural oferece a capacidade de predizer a eficácia clínica de tratamento humano durante estudos pré-clínicos. Isso foi constatado como verdadeiro em MPS I (modelo canino). Com isso em mente, foram realizados estudos com o gato com MPS I, antes do início de 25 estudos humanos para essa doença. Existem dados de segurança e de eficácia suficientes para se proceder a um teste clínico em pacientes de MPS I humana.

Estudos de rhASB em gatos com MPS VI indicam que nenhum gato morreu como um resultado da administração da 30 droga. Conforme previsto, experimentos em gatos com MPS VI também indicam que a assimilação de rhASB é dependente da presença de cadeias laterais de carboidratos modificadas por manose-6-fosfato. A rhASB em gatos com MPS VI também

mostrou eliminar o armazenamento a partir de uma variedade órgãos importantes e altera moderadamente a densidade óssea. Estudos de eficácia de variação de dose de longo prazo sugerem que uma dose de 1 mg/Kg é a mais baixa 5 concentração para se ver benefícios clínicos significativos. Também têm sido realizados estudos para comparar a distribuição de enzima, eliminação de armazenamento de glicosaminoglicano dos tecidos e diminuição dos níveis de glicosaminoglicano urinário depois 10 de infusão de bolo e lenta (2 horas). Estudos em progresso continuam a avaliar a segurança de infusões semanais da dose clínica projetada de 1 mg/Kg de rhASB em gatos 15 sofrendo de MPS VI.

Uma forma espontânea de MPS VI em várias famílias de 20 gatos siameses foi identificada nos anos de 1970 (Jezyk, Science 198: 834-36 (1977)), e relatos detalhados das mudanças patológicas nesses animais têm sido publicados 25 (Haskins et al., Am. J. Pathol. 101: 657-674 (1980); Haskins et al., J. Am. Vet. Med. Assoc. 182: 983-985; Konde et al., Vet. Radiol. 28: 223-228 (1987)). Embora a apresentação clínica desses gatos seja algo variável, todos 30 eles exibem mudanças gerais que têm sido relatadas na literatura (Jezyk et al., Science 198: 834-36 (1977)); Konde et al., Vet. Radiol. 28: 223-228 (1987); Crawley, "Terapia de Reposição de Enzima em um Modelo Felino de Mucopolissacaridose do Tipo VI", tese de doutorado, Universidade de Adelaide, Adelaide, Austrália, (1988)). A Tabela 6 foi construída a partir dessas fontes para fornecer as mudanças "médias" que esperar-se-ia observar em 35 um gato com MPS VI não tratado:

**Tabela 7: Modelo de Gato com MPS VI**

| Observação Clínica | Cronologia do Início | Mudanças Relativas à Doença Humana (independentemente de |
|--------------------|----------------------|--|
|--------------------|----------------------|--|

| tempo)   |   |  |
|--|---|--|
| • Dismorfia facial:<br>• Cabeça pequena,<br>• Maxila larga<br>• Orelhas pequenas   | 2 meses   | • Similar à doença humana  |
| • Enevoamento difuso da córnea   | 2 meses   | • Similar à doença humana  |
| • Anormalidades ósseas:<br>• Displasia epifiseal<br>• Subluxações<br>• Pectus excavatum  | Primeiros sinais em 2 meses - progressivos  | • Similar à doença humana<br>- alterações de calcificação endocondral  |
| • Peso do corpo reduzido   | 3 meses   | • Similar à doença humana  |
| • Flexibilidade de espinha cervical reduzida   | Valor normal em gatos é de 180° em todas as idades. Em MPS VI:<br>3 meses: 130 a 170°<br>5 meses: 45 a 130°<br>6 meses: 30 a 100°<br>11 meses: 20 a 80° | • Similar à doença humana  |
| • Osteoporose / Doença de Junta Degenerativa   | 1 ano ou mais   | • Similar à doença humana  |
| • Defeitos de marcha dos membros traseiros<br>• Paresia ou paralisia dos membros traseiros (compressão do cordão toracolombar) | Ver tabela abaixo   | • Síndrome do túnel carpal<br>• Subluxação de C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub><br>• Compressão do cordão cervical de dura secundária a espessa mais típica |
| • Fígado e baço flagrantemente normais   |   | Fígado e baço aumentado em humanos   |
| • Válvulas cardíacas espessadas  |   | • Similar à doença humana  |
| Nenhuma lesão no sistema nervoso central - leve aumento do ventrículo lateral  |   | • Pode ser comparável à hidrocefalia em humanos  |

Outras determinações bioquímicas / morfológicas indicam que, em 35 dias, os órgãos dos gatos não tratados têm armazenamento máximo de glicosaminoglicanos nos tecidos (Crawley et al., J. Clin. Invest. 99: 651-662 (1997)). Os níveis urinários de glicosaminoglicanos são elevados no nascimento tanto em gatos normais quanto em gatos com MPS VI, mas, depois de aproximadamente 40 dias, os gatos normais diminuem seus níveis. Os glicosaminoglicanos urinários de gatos com MPS VI permanecem elevados ou continuam a aumentar até alcançarem o estado estacionário depois de aproximadamente 5 meses.

A variabilidade de apresentação clínica é vista em companheiros de ninhadas afetados. Em adição a alguma variabilidade na cronologia de inicio de anormalidades particulares, o curso de progressão no tempo para algumas das mudanças clínicas e patológicas é também variável. Em geral, as lesões ósseas são tipicamente progressivas (Konde et al, Vet. Radiol. 28: 223-228 (1987)), enquanto que o enevoamento da córnea não é. Além disso, observou-se que alguns gatos paralisados melhoram de paresia severa com o tempo. Estudos detalhando a progressão da doença em gatos individuais estão limitados a observações clínicas (ou radiológicas). Algumas dessas têm correlações patológicas distintas, tais como perda neurológica e compressão de cordão secundários à proliferação de tecido ósseo na região toracolumbar (Haskins et al, J. Am. Vet. Med. Assoc. 182: 983-985 (1983)).

Conduziu-se um estudo de eficácia de seis meses de terapia de reposição de enzima, usando ASB felina recombinante em gatos recém-nascidos com MPS VI. Isso foi sugerido pela observação de que vários gatos com MPS VI tratados desenvolveram anticorpos contra a enzima humana (ver a Seção 6.5). Esses anticorpos podem alterar a assimilação e a estabilidade da enzima (Brooks et al, Biochim. Biophys. Acta 1361: 203-216 (1997)). A enzima felina foi infundida em 1 mg/Kg semanalmente. As principais conclusões do estudo foram que os GAG urinários, peso / crescimento do corpo, morfometria óssea e eliminação de material armazenado a partir de vários tecidos, foram aperfeiçoadas com relação à mesma dose de enzima recombinante humana usada no estudo prévio, que os anticorpos não foram detectados além da faixa observada em gatos normais, e que a dose de enzima felina em 1 mg/Kg foi comparável em reverter a doença à dose de enzima humana de

5 mg/Kg em uma comparação cabeça a cabeça (Bielicki et al, J. Biol. Chem. 274: 36335-43 (1999)). Esses estudos indicam que uma melhoria incremental de estados finais e de imunogenicidade é possível quando enzima derivada de gato é dada a gatos. Isso fornece suporte adicional à dosagem de pacientes humanos com a enzima humana em 1 mg/Kg/semana. Os resultados desse estudo são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 8: Eficácia de Injeções Semanais de Bolo de ASB  
Felina Recombinante Derivada de CHO em Gatos Recém-Nascidos  
com MPS VI**

10

| Resultados                              |  |  |
|---|--|--|
| Dose                                    | 1 mg/Kg  |  |
| Duração                                 | 6 meses (n = 2)  | 3 meses (n = 3)  |
| GAGs urinários                          | Diminuiram para 2 x o normal   | Diminuiram para 2 x o normal   |
| Título em anticorpos                    | • Dentro da faixa observada em gatos normais   | • A ser completado   |
| Clínicos                                |  |  |
| Aparência                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enevoamento da córnea persistente</li> <li>• Alguma resolução de dismorfia facial</li> <li>• Forma do corpo aperfeiçoada</li> </ul>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enevoamento da córnea persistente</li> <li>• Alguma resolução de dismorfia facial</li> <li>• Forma do corpo aperfeiçoada</li> </ul> |
| Peso                                    | • Mais pesado do que o normal  | • Ligeiramente mais leve do que o normal   |
| Flexibilidade Espinal (normal = 180°)   | • 160 a 180°   | • Não examinada  |
| Neurológicos                            | • Normal   | • Normal   |
| Radiologia                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualidade aperfeiçoada</li> <li>• Densidade e dimensões de osso (similar a 1 mg/Kg de rh4S na ref. 10)</li> </ul>                       | • Não examinada  |
| Em conjunto                             |  |  |
| Espessura de Osso / Cartilagem          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Variável; espessura de cartilagem diminuída</li> <li>• Osso subcondral mais uniforme (similar a 1 mg/Kg de rh4S<sup>2</sup>)</li> </ul> | • Não examinada  |
| Cordão Espinal                          | • Nenhuma presença de compressão   | • Não examinada  |
| Nível Celular                           |  |  |
| Fígado (Kupffer)                        | • Completa eliminação de armazenamento lisossomial   | • Completa eliminação de armazenamento lisossomial   |
| Pele                                    | • Redução quase completa de armazenamento  | • Redução leve   |
| Córnea / Cartilagem (orelha, articular) | • Nenhuma eliminação de armazenamento lisossomial em comparação com controles com MPS VI não tratados  | • Nenhuma eliminação de armazenamento lisossomial  |
| Válvulas do coração                     | • Redução significativa de armazenamento lisossomial   | • A ser completado   |
| Aorta                                   | • Redução quase completa de  | • Redução leve de  |

|         | armazenamento lisossomial | armazenamento lisossomial |
|---------|---------------------------|---------------------------|
|         | Resultados                |                           |
| Dose    | 1 mg/Kg                   |                           |
| Duração | 6 meses (n = 2)           | 3 meses (n = 3)           |
|         | armazenamento lisossomial | armazenamento lisossomial |

A Tabela 9 fornece um sumário de todos os estudos realizados usando-se ASB humana recombinante no modelo de gato com MPS VI.

**Tabela 9**  
**Resultados de Estudo de rhASB**

| Gato número | Dose           | Duração (meses) | Rota de Administração | GAGs Urinários   | Histopatologia   |
|-------------|----------------|-----------------|-----------------------|--|--|
| 1           | 0,8 mg/Kg/ 14d | 7 - 22          | Bolus i.v.            | Diminuiram 50% em comparação ao gato não tratado                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Normalização de vacuolização no fígado</li> <li>Redução significativa nos rins e pele</li> </ul>  |
|             | 1,5 mg/Kg/ 7d  | 22 - 27         | Bolus i.v.            | Diminuiram até próximo do normal   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma correção na córnea e em condrocitos</li> <li>Nenhuma deposição complexa nos rins</li> </ul>   |
| 1           | 0,5 mg/Kg/ 14d | 12 - 23         | Bolus i.v.            | Diminuiram   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Redução significativa de armazenamento lisossomial em células hepáticas</li> <li>Nenhuma evidência de comprometimento renal ou deposição complexa imune glomerular</li> </ul>   |
|             | 1,4 mg/Kg/ 7d  | 23 - 27         | Bolus i.v.            | ND   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Redução significativa de armazenamento lisossomial em válvulas cardíacas</li> <li>Teor de armazenamento em gradiente de média para adventícia na aorta</li> </ul>   |
| 1           | 0,8 mg/Kg/ 14d | 2 - 15          | Bolus i.v.            | Redução marginal comparada com não tratado   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Leve redução de armazenamento lisossomial de pele (junta do quadril, dura, rins)</li> <li>Nenhuma evidência de comprometimento renal ou de deposição glomerular</li> </ul>  |
|             | 0,2 mg/Kg/ 8d  | 6               | Bolus i.v.            | ND   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma mudança significativa de armazenamento lisossomial de córnea / cartilagem</li> <li>Armazenamento lisossomial completa em eliminado no fígado e pele (junta do quadril, dura, rins)</li> <li>Nenhuma evidência de comprometimento renal ou de</li> </ul> |
| 2           |                |                 |                       |  |  |
|             |                |                 |                       |  |  |
| 1           | 1 mg/Kg/ 7d    | 5/6             | Bolus i.v.            | Diminuiram e mantiveram-se em 3 x o normal comparado ao não tratado em 10 x o normal |  |
|             |                | 11              | Bolus i.v.            |  |  |

|   |                               |     |   |   |  |
|---|-------------------------------|-----|---|---|--|
| 2 |                               | 5/6 | Bolus i.v.  | Diminuição e<br>mantiveram-se<br>em 2 x o normal<br>comparado ao<br>não tratado em<br>10 x o normal             | deposição glomerular<br>• Redução próximo de completa em armazenamento<br>lisossomial em válvulas cardíacas  |
| 1 | 5 mg/Kg/<br>7d                | 1/1 | Bolus i.v.  |   | • Banda delgada de células vacuolizadas na túnica<br>média exterior  |
| 2 | 0,5 mg/Kg/<br>2x na<br>semana | 6   | Bolus i.v.  | Diminuição para<br>3x o normal  | • Eliminação lisossomial completa no fígado<br>• Redução leve a moderada na pele   |
| 2 | 1 mg/Kg/<br>7d                | 1   | Infusão longa<br>(2 h)<br>Infusão curta<br>(10 min) | Diminuíram<br>depois da<br>primeira ou<br>segunda infusão<br>para abalo dos<br>gatos com MPS<br>VI não tratados | • Redução variável de armazenamento lisossomial de<br>válvulas cardíacas<br>• Leve redução de armazenamento na aorta<br>• Eliminação lisossomial completa no fígado<br>• Redução leve a moderada na pele |
| 5 | 1 mg/Kg/<br>7d                | 6   | Infusão longa<br>(2 h)                              |   | • Redução variável de armazenamento lisossomial de<br>válvulas cardíacas<br>• Leve redução de armazenamento lisossomial na<br>aorta  |

**EXEMPLO 3****Distribuição e Praticabilidade**

Foi realizado um estudo inicial para documentar a assimilação e a distribuição de enzima, e para servir como 5 um estudo piloto de potenciais estados terminais para futuros estudos de eficácia (Crawley et al, J. Clin. Invest. 97: 1864-1873 (1996)). ASB humana recombinante foi administrada por injeção em bolus a gatos afetados, uma vez por semana ou uma vez a cada duas semanas, em 0,5 até 1,5 10 mg/Kg. A avaliação de um gato com MPS VI não tratado (gato D) e de um gato normal forneceram os valores a partir dos quais as comparações foram extraídas. Os dados a partir de um gato não tratado foram adicionalmente suportados por avaliação histórica de 38 gatos não tratados adicionais. Os 15 estudos de assimilação e de distribuição agudas foram conduzidos em gatos normais usando uma técnica de ensaio imune, que permitiu a detecção de ASB humana na presença de enzima de gato normal.

As principais conclusões desses estudos demonstraram 20 ampla assimilação de enzima com a esperada predominância de assimilação no fígado e no baço, conforme observado em outros estudos de reposição de enzima, em modelos de animais com MPS. A eficiência de assimilação era dependente da presença de cadeias laterais de carboidrato modificadas 25 por manose-6-fosfato na enzima. A meia-vida da enzima foi determinada como sendo de 2 a 4 dias. Terapeuticamente, a enzima eliminou o armazenamento a partir de uma variedade de órgãos principais e alterou moderadamente a densidade óssea. A córnea, a morfologia óssea e os defeitos de 30 cartilagem não foram tratados de maneira eficaz em gatos mais idosos com MPS VI. Os resultados do estudo estão resumidos na Tabela 10.

**Tabela 10: Sumário: Estudo de Distribuição /**  
**Praticabilidade em Gato com MPS VI**

| Parâmetro<br>Gato  | Constatação  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|
|  | A  | B  | C  |  |  |
|  | Tratado com MPS VI   | Tratado com MPS VI   | Tratado com MPS VI   |  |  |
| <b>Dose</b>  | 0,8 mg/Kg por 14 d   | 1,5 mg/Kg por 7 d  | 0,5 mg/Kg por 14 d   |  |  |
| <b>Idade na dose (meses)</b>   | 7 - 22*  | 22 - 27  | 12* - 33   |  |  |
| <b>Parâmetros de infusão</b>   | 2 - 10 mL (PBS) via veia cefálica durante 5 - a 20 minutos   |  |  |  |  |
| <b><math>t_{1/2}</math> no Plasma (bolo i.v.)</b>                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>13,7 \pm 3,2</math> min @ 1 mg/Kg</li> <li>• 45 min @ 7,5 mg/Kg</li> </ul>  | <p>Todos os valores relativos à enzima de ASB felina endógena quatro horas depois da infusão de 1 mg/Kg de rhASB em gatos normais</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fígado: 495 x</li> <li>• Baço: 6 x</li> <li>• Pulmão: 22,3 x</li> <li>• Coração: 4,3 x</li> <li>• Aorta: 4 x</li> <li>• Pele: 31 x</li> <li>• Cartilagem: 0 x</li> <li>• Córnea: 0 x</li> </ul> |  |  |  |
| <b><math>t_{1/2}</math> no Tecido</b>  | 2 - 4 dias @ 1 mg/Kg na maioria dos órgãos (enzima detectável na maioria dos tecidos do Gato B, mas, somente no fígado de A depois de 7 dias)  |  |  |  |  |
| <b>Neurológicos</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ambulação flutuou, mas melhorou em dose mais elevada</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não disponível</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Progressão marginal para porta parética no final do estudo</li> </ul> |  |  |
| <b>Opacidade da córnea</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não se modificou com a terapia (exame com lâmpada de fenda 3x mais tarde em rx)</li> </ul>  |  |  |  |  |
| <b>Esquelético (raios x)<br/>4 vistas a cada 3 mês</b>                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• As lesões progrediram (nenhuma melhora radiográfica)</li> <li>• Volume ósseo aumentado / trabecular # no Gato C (recebeu rx mais cedo)</li> <li>• Compressão vertebral no Gato C</li> </ul> |  |  |  |  |
| <b>Anafilase</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nenhuma anafilase, distensão mínima na infusão:</li> </ul>  |  |  |  |  |
| <b>Resposta de anticorpos (título em Ig)</b><br>MPS VI não tratados = 4.000 - 32.000 | $1 \times 10^6$<br>(plasma poderia inibir a atividade de enzima in vitro)  | 64.000   | 64.000   |  |  |
| <b>GAGs Urinários (~ 400 dias)</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuíram 50% em comparação ao gato não tratado</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuíram próximo ao normal</li> </ul>   |  |  |  |
| <b>Sulfato de dermatano urinário (~ 400 dias)</b>                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediano para todos os 3 gatos (com relação ao controle não tratado D e normal)</li> </ul>   |  |  |  |  |
| <b>Peso do corpo</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,5 - 3,0 Kg versus normal de 4-7 Kg</li> </ul>   |  |  |  |  |
| <b>Fígado / baço</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flagrantemente normal</li> </ul>  |  |  |  |  |
| <b>Válvulas do coração</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flagrantemente normal</li> </ul>  |  |  |  |  |
| <b>Cartilagem</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Espessura e formação anormais</li> </ul>  |  |  |  |  |
| <b>Microscopia</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Normalização da vacuolização no fígado</li> </ul>   |  |  |  |  |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| (vacuolização)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Redução significativa nos rins e na pele</li> <li>Nenhuma correção na córnea e em condrócitos</li> </ul> |
| Deposição complexa imune nos rins | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ausente</li> </ul>   |

**EXEMPLO 4****Eficácia em Gatos com MPS VI Tratados desde o Nascimento**

Um estudo de eficácia com variação de dose de longa duração foi realizado em gatos com MPS VI, iniciando no nascimento (Crawley et al, J. Clin. Invest 99: 651-662 (1997)), e está resumido na tabela 10. Gatos com MPS VI foram tratados semanalmente com injeções i.v. de bolus de 0,2, 1 e 5 mg/Kg de rhASB, iniciando no nascimento. Um total de 09 gatos foram tratados durante 5, 6 ou 11 meses.

Além disso, 12 gatos com MPS VI e 9 normais foram incluídos como controles não tratados. As principais conclusões são que a dose de 0,2 mg/Kg não alterou a progressão da doença no gato estudado, e o único benefício clínico documentado foi uma redução no armazenamento nas células de Kupffer do fígado. Os níveis de GAGs urinários diminuíram para próximos ao normal durante o teste nos grupos de dose mais elevada. Além das melhorias nos órgãos principais, as doses mais elevadas de terapia desde o nascimento foram capazes de prevenir ou de melhorar a deformidade óssea da espinha e a forma anormal de muitos ossos. Houve um efeito dependente da dose no aperfeiçoamento de volume mineral ósseo da vértebra L<sub>5</sub>, de espessura trabecular óssea e densidade de superfície óssea entre as doses de 1 e 5 mg/Kg, apesar de ambas serem equivalentes em aperfeiçoar a taxa de formação de osso em 5 a 6 meses de ERT (Byers et al, Boné 21: 426-431 (1997)). A válvula mitral e a aorta eram dependentes de dose e forma menos completos em 1 mg/Kg, mas, aproximadamente completo em 5 mg/Kg. Nenhum melhoramento de armazenamento em cartilagens e na córnea foi observado em qualquer dose. O estudo sugere que a dose de 1 mg/Kg/semana

é a concentração mais baixa para se ver benefício clínico significativo. Os resultados do estudo estão sumarizados na Tabela 11.

TABELA 11

5 Eficácia de Injeções de Bolus Semanais de ASB Recombinante Humana Derivada de CHO em Gatos Recém-Nascidos com MPS VI  
(Estudo PC-BM102-002)

|  |  | Resultados  |  |  |   |
|--|--|---|--|--|---|
| Dose   |  | 1 mg/Kg   |  | 5 mg/Kg  |   |
| Duração  |  | 5/6 meses   | 11 meses   | 5/6 meses  | 11 meses  |
| N  |  | 4   | 1  | 2  | 1   |
| <b>Bioquímica</b>  |  |   |  |  |   |
| GAGs Urinários   |  | • Diminuíram e mantiveram-se em 3x o normal em comparação ao não tratado em 10 x o normal |  | • Diminuíram e mantiveram-se em 2x o normal em comparação ao não tratado em 10 x o normal      |   |
| <b>Clínicos</b>  |  |   |  |  |   |
| Aparência  |  | • Mudanças variáveis<br>• Enevoamento persistente de córnea por lâmpada de fenda          |  | • Mudanças variáveis<br>• Enevoamento persistente de córnea por lâmpada de fenda               |   |
| Peso   |  | • Intermediário (nenhum rx versus normal)   |  | • Intermediário (nenhum rx versus normal)  |   |
| Flexibilidade da espinha (normal = 180°) (não tratados com MPS VI = 90°) |  | 130-160°  | 90°  | 180°   | 160°  |
| Neurológicos   |  | • Paralisia leve de 1 a 4 membros traseiros   | • Nenhum deficit   | • Nenhum deficit   | • Nenhum deficit                                    |
| Radiologia   |  | • Qualidade, densidade e dimensões ósseas aperfeiçoadas                                   |  | • Qualidade, densidade e dimensões ósseas aperfeiçoadas<br>• Possivelmente, superior a 1 mg/Kg |   |
| <b>Em conjunto</b>   |  |   |  |  |   |
| Espessura Óssea/Cartilagem   |  | • Variabilidade, mas, melhorou  | • Doença de junta degenerativa presente                  | • Variabilidade, mas, melhorou   | • Doença de junta degenerativa presente             |
| Cordão espinhal  |  | • 1 de 4 com várias compressões leves   | • Nenhuma compressão                                     | • Nenhuma compressão de cordão   |   |
| <b>Nível celular</b>   |  |   |  |  |   |
| Fígado (Kupffer)   |  | • Completa eliminação de armazenamento lisossomial  | • Mantido  | • Completa eliminação de armazenamento lisossomial   | • Mantido   |
| Pele (junta dura do quadril, rins)                                       |  | • Nenhuma evidência de comprometimento renal ou de deposição                              | • Leve redução de armazenamento lisossomial<br>• Nenhuma | • Completa eliminação de armazenamento lisossomial<br>• Nenhuma                                | • Mantido<br>• Nenhuma evidência de comprometimento |

|                                       | complexa<br>imune<br>glomerular                                 | evidência de<br>comprometimento<br>renal ou de<br>deposição<br>glomerular                      | evidência de<br>comprometimento<br>renal ou de<br>deposição<br>glomerular | ento renal<br>ou de<br>deposição<br>glomerular               |
|---------------------------------------|---|--|---|--|
| Córnea/cartilagem (orelha, articular) | • Não disponível  | • Nenhuma mudança significativa de armazenamento lisossomial                                   | • Não disponível  | • Nenhuma mudança significativa de armazenamento lisossomial |
| Válvulas Cardíacas                    | • redução significativa (variável) de armazenamento lisossomial | • redução significativa (variável) de armazenamento lisossomial próximo de eliminação completa | • redução próxima da completa de armazenamento lisossomial                |  |
| Aorta                                 | • Gradiente de teor de armazenamento                            |  | • Banda delgada de células vacuolizadas na túnica exterior média          |  |

#### EXEMPLO 5

##### Eficácia de Infusões Duas Vezes na Semana de ASB Humana

##### Recombinante em Gatos com MPS VI Recém-Nascidos

5 Um estudo de seis meses foi realizado em gatos recém-nascidos para avaliar uma infusão de 0,5 mg/Kg dada duas vezes na semana. Além disso, a enzima usada nesse estudo foi derivada exclusivamente de linhagem de células CSL-4S-342. As principais conclusões do estudo incluem que,

10 comparado com a dose semanal de 1 mg/Kg previamente relatada, esse estudo produziu aperfeiçoamentos similares nos parâmetros físicos, bioquímicos, neurológicos e radiográficos. As diferenças mais notáveis foram flexibilidade de espinha cervical que foi ligeiramente

15 piorada e menos eliminação de armazenamento lisossomial nos tecidos conectivos mais densos, tais como válvulas do coração e aorta. Os resultados são sumarizados na Tabela 12.

##### Tabela 12: Eficácia de Injeções de Bolus Duas Vezes por

20 Semana de ASB Humana Recombinante Derivada de CHO em Gatos

Recém-Nascidos com MPS VI

| Parâmetro                               | Resultados   |
|---|--|
| Dose                                    | 0,5 mg/Kg  |
| Duração                                 | 2x semanalmente: 6 meses (n = 2; gatos, 225 f, 226 m)  |
| GAGs urinários                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuíram para 3 x o normal</li> </ul>   |
| Títulos em anticorpos                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Dentro da faixa observada em gatos normais</li> </ul>   |
| Clinicos                                |  |
| Aparência                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Enevoamento da córnea persistente</li> <li>Alguma resolução de dismorfia facial</li> <li>Forma do corpo aperfeiçoada</li> </ul> |
| Peso                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Intermediário (entre nenhum tratamento e normal)</li> </ul>   |
| Flexibilidade espinhal (normal = 180°)  | 90 - 150°  |
| Neurológicos                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma paralisia de membros traseiros</li> </ul>   |
| Radiologia                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Qualidade, densidade e dimensões ósseas melhoradas (similares à 1 mg/Kg de rh4S na ref. 110)</li> </ul>                         |
| Em conjunto                             |  |
| Espessura de Osso / Cartilagem          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Variável; espessura de cartilagem diminuída e osso subcondral mais uniforme (similar à 1 mg/Kg rh4S<sup>3</sup>)</li> </ul>     |
| Cordão espinhal                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma compressão presente</li> </ul>  |
| Nível Celular                           |  |
| Figado (Kupffer)                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Eliminação lisossomial completa</li> </ul>  |
| Pele                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Redução de armazenamento de leve à moderada</li> </ul>  |
| Córnea / Cartilagem (orelha, articular) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma eliminação de armazenamento lisossomial comparado com controles com MPS VI não tratados</li> </ul>                      |
| Válvulas cardíacas                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Redução variável de armazenamento lisossomial (completa em 225 f; nenhuma mudança dos não tratados em 226 m)</li> </ul>         |
| Aorta                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Leve redução de armazenamento lisossomial</li> </ul>  |

#### EXEMPLO 6

##### Avaliação de Assimilação e de Distribuição de Enzima como uma Função da Taxa de Infusão de Enzima em Gatos com MPS VI

O objetivo primário desse estudo foi comparar a distribuição de enzima, a eliminação armazenamento de GAG em tecido e a diminuição de níveis de GAGs urinários depois de infusão de bolo e depois de infusão lenta (2 horas) de uma dose de 1 mg/Kg idêntica. A proposta de administração lenta baseia-se em experiência de estudos pré-clínicos e clínicos de  $\alpha$ -L-iduronidase para o tratamento de MPS I. Além disso, o estudo forneceu os primeiros dados de que a enzima produzida em BioMarin, a partir da linhagem de células CSL-4S-342, é biologicamente ativa e segura. As principais conclusões do estudo incluem que todos os quatro gatos (dois por grupo) tratados nesse estudo não mostraram qualquer reação adversa aguda tanto com relação à infusão

lenta quanto à rápida, e quaisquer efeitos prejudiciais de repetidas infusões com a enzima. No entanto, a infusão de bolo resulta em elevada assimilação no fígado, o que não é preferido. A infusão lenta fornece melhor distribuição nos tecidos e, portanto, é um método preferido para o teste clínico.

A distribuição nos tecidos de rhASB obtida no estudo sugeriu que infusões de 2 horas poderiam aumentar os níveis de enzima em outros órgãos além do fígado, incluindo atividade no cérebro. A redução de GAG urinária foi observada imediatamente, depois da primeira ou segunda infusão, para níveis abaixo da faixa observada em gatos com MPS VI não tratados. A correção do armazenamento lisossomial foi observada em células reticuloendoteliais e de modo muito leve em alguns fibroblastos (válvula do coração) e células musculares lisas (aorta) depois de 5 infusões. Nenhuma resposta clínica significativa foi observada em cada grupo, no entanto, isso não era esperado devido à curta duração do estudo, e devido ao fato de que o início da terapia já se tinha desenvolvido depois de mudanças de doença significativas. A infusão estendida por 2 horas foi segura e bem tolerada, com relação aos protocolos mais curtos usados em estudos prévios. A infusão de 2 horas pode fornecer melhoramento de distribuição de enzima com base no gato que foi avaliado com relação à distribuição de enzima.

#### **EXEMPLO7**

##### **Avaliação de Segurança de 6 Meses de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase Humana Recombinante em Gatos Afetados com MPS**

30

**VI**

Dois estudos de 6 meses em gatos com MPS VI foram iniciados usando-se a enzima produzida pelo processo de preparação de acordo com a presente invenção. A finalidade

desses estudos é avaliar a segurança e a eficácia de infusões semanais da dose clínica humana projetada de rhASB em gatos sofrendo de MPS VI. O Estudo 6 envolve gatinhos que receberam dose inicialmente em 3 a 5 meses de idade. O 5 Estudo 7 envolve gatinhos tratados desde o nascimento com infusões semanais da dose clínica humana projetada de rhASB. Os estudos pretenderam abordar a toxicologia potencial. Os gatos serão observados com relação a mudanças de comportamento durante a infusão da enzima recombinante 10 para se avaliar possíveis respostas imunes. O soro será monitorado com relação à depleção complementar e com relação à formação de anticorpos direcionados contra a enzima recombinante. A função de órgão geral será monitorada por painéis de química clínicos completos 15 (funções dos rins e do fígado), urinálise e contagens sangüíneas completas (CBC) com diferencial. Os níveis de glicosaminoglicanos urinários serão monitorados em uma base semanal em um conjunto de pontos no tempo, com relação à infusão de enzima. A evidência de aperfeiçoamentos clínicos 20 da doença será documentada. Esses dados fornecerão avaliação adicional da potencial eficácia do tratamento e validarão a atividade e a assimilação da enzima *in vivo*. Os estudos foram e serão conduzidos de uma maneira consistente 25 com os princípios e práticas de regulamentação de GLP, tanto quanto possível.

Resultados preliminares do primeiro estudo indicam que a administração de rhASB não teve quaisquer efeitos prejudiciais sobre qualquer dos animais, com os pesos corporais e as análises químicas clínicas, em geral, 30 mantendo-se dentro das faixas de referência. Entretanto, ambos os gatos com títulos de anticorpos significativamente elevados desenvolveram sinais clínicos anormais durante as infusões, contudo, ambos os animais se comportaram

normalmente uma vez que as infusões de enzima cessaram, e não pareceram sofrer quaisquer efeitos de doença de longa duração. Tempos de infusão estendidos (4 horas) e pré-medicação aumentada com anti-histamínicos permitiram a 5 terapia continuada nos gatos sem quaisquer sinais clínicos anormais. Leve redução em níveis de GAG urinários sugere alguma eficácia de terapia em reduzir glicosaminoglicanos armazenados nos tecidos e na circulação, contudo, flutuações nesses níveis fossem observadas durante o tempo, 10 tornando difícil a interpretação. Nenhum dos 5 gatos mostrou melhorias clínicas óbvias em resposta a ERT, mas, isso exigiria pelo menos tratamento de 6 meses, com base em estudo prévios. Os títulos em anticorpos se desenvolveram em quatro dos cinco gatos, com aumentos observáveis de 15 títulos observados depois de 2 meses de ERT. Dois desses gatos desenvolveram títulos significativamente elevados depois de 2 ou 3 meses.

#### **EXEMPLO 8**

##### **Perfil de Segurança para Gatos com MPS VI Tratados com**

##### **rhASB**

Iniciou-se um estudo arrolando gatos afetados que foram tratados dentro de 24 horas do nascimento. Quarenta e um gatos com MPS VI foram tratados usando-se rhASB. A administração da enzima a gatos normais se restringiu a um 25 ou dois gatos para confirmar a segurança aguda de novas bateladas antes da exposição dos animais afetados valiosos à terapia. Em resumo, nenhum gato com MPS VI morreu como resultado da administração da droga, embora quatro gatos tenham morrido como resultado de infecção viral ou de 30 anormalidade congênita subjacente. A enzima para os estudos foi produzida de acordo com os métodos de produção da presente invenção. Os dados preliminares são mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13: Resumo de Estudo de Eficácia em Gatos  
do Laboratório de Hopwood**

| Estudo<br>nº | Nº de Gatos | Dose/semanal<br>(mg/Kg) | Comprimento Rx<br>(meses) | Mortalidade                              |
|--------------|-------------|-------------------------|---------------------------|--|
| 1            | 2           | Variável                | 13 - 21                   | Nenhuma                                  |
|              | 1           |                         |                           |  |
| 2            | 1           | 0,2                     | 5                         | Nenhuma                                  |
| 2            | 1           | 0,2                     | 1                         | Morreu: defeito<br>cardíaco<br>congênito |
| -            | 2           | 0,5                     | 3 - 5                     | 1 morreu de<br>parvovirose               |
| 2            | 4           | 1                       | 3 - 11                    | 1 morreu de<br>parvovirose               |
|              | 2           |                         |                           |  |
| -            | 1           | 1                       | 6 (s.c.)                  | Nenhuma                                  |
| -            | 4           | 1                       | 6                         | Nenhuma                                  |
| 2            | 2           | 5                       | 3 - 11                    | 1 morreu de<br>parvovirose               |
|              | 2           |                         |                           |  |
| 4            | 2           | 0,5 (duas<br>vezes)     | 5                         | Nenhuma                                  |
| -            | 3           | 0,5 (duas<br>vezes)     | 5                         | Nenhuma                                  |
| 5            | 4           | 1                       | 1                         | Nenhuma                                  |
| 6            | 5           | 1                       | Iniciou                   | Nenhuma                                  |
| 7            | 5           | 1                       | Iniciou                   | Nenhuma                                  |

#### **EXEMPLO 8A**

##### **5 Distribuição nos Tecidos com Infusão Lenta**

Um estudo em separado foi empreendido para comparar a taxa de assimilação e a distribuição nos tecidos de rhASB em gatos com MPS VI jovens (< 10 semanas de idade no início) usando-se um protocolo de infusão longa (duas horas) ou curta (10 - 15 minutos) (ASB-PC-004). Sete gatos normais (12 - 24 meses de idade) foram sedados e tiveram cânula de artéria femoral implantada para permitir a amostragem do sangue. A rhASB em uma dose de 1,0 mg/Kg ou 7,3 mg/kg foi infundida na veia cefálica em um volume de 7 mL, durante 40 segundos. Amostras de sangue arterial heparinizadas foram obtidas em aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos após a dose. O plasma foi coletado por centrifugação e congelado até a análise. Depois de quatro horas, os animais foram submetidos à eutanásia e os tecidos foram coletados, pesados e congelados até a análise.

Em um estudo em separado, três gatos normais (8 - 66 meses de idade) receberam uma dose de bolus de 1,0 mg/Kg i.v. de rhASB em um volume de dose de 7 mL. Um gato por ponto no tempo foi submetido à eutanásia em 4, 4 ou 7 dias 5 após a dose. Tecidos selecionados foram coletados, pesados e congelados até a análise. Um gato normal adicional, não exposto a rhASB, foi submetido à eutanásia para fornecer 10 níveis de ASB felina nos tecidos para comparações analíticas. Realizou-se a quantificação de rhASB ou de ASB felina no plasma e nos tecidos, utilizando-se uma técnica de ensaio ELISA. rhASB nas amostras foi adsorvida em um anticorpo monoclonal anti-rhASB imobilizado e a ASB felina foi absorvida em anticorpo anti-rhASB policlonal, que reage de maneira cruzada com ASB felina. A ASB absorvida foi, 15 então, quantificada usando-se substrato afluorescente.

Análises de concentração de plasma mostraram que a  $t_{1/2}$  de rhASB na dose de 1,0 mg/Kg era de  $13,7 \pm 3,2$  minutos e era de  $\sim 45$  minutos para a dose de 7,3 mg/Kg. O  $t_{1/2}$  nos tecidos seguindo a dose de 1,0 mg/Kg variou desde 2,4 - 4,2 20 dias no fígado, baço, pulmão, rins e coração. Níveis baixos, porém, detectáveis, foram vistos nesses tecidos (exceto no coração) até sete dias seguindo-se à dosagem. Quatro horas depois de uma dose de 1,0 mg/Kg de ASB, a maioria da dose liberada no fígado foi detectada em todos 25 os tecidos medidos, exceto cartilagens e córneas, com a maioria no fígado. Com a exceção do cérebro e do cerebelo, os níveis foram de 4 (aorta) a 495 (fígado) vezes maiores do que aqueles de ASB felina no gato de controle não tratado. As meias-vidas determinadas nos tecidos nesses 30 estudos (2,4 - 4,2 dias em 1,0 mg/Kg) suportam a freqüência de dosagem clínica semanal.

O objetivo primário desse estudo foi avaliar os efeitos da taxa de infusão na distribuição da enzima, na

eliminação de armazenamento de GAG nos tecidos e a diminuição dos níveis de GAGs urinários. Aos grupos (n = 2/grupo) de gatos com MPS VI de 10 semanas de idade foram administradas infusões i.v. curtas (10 - 15 minutos) ou 5 longas (2 horas) de rhASB, a 1,0 mg/Kg, uma vez por semana, durante cinco semanas. Os animais foram submetidos à eutanásia dois dias depois da última infusão e os tecidos selecionados (fígado, baço, coração, pulmão, rim, pele, aorta, cérebro, cerebelo, cartilagem, córnea e nódulos 10 linfáticos) foram coletados para determinação da atividade de ASB e para a avaliação histopatológica. Os tecidos foram armazenados congelados até a análise. O estudo empregou o mesmo ensaio imune para determinar os níveis de ASB nos tecidos conforme descrito acima (ASB-PC-001). Um gato no 15 grupo de infusão de duas horas reduziu os níveis de enzima nos tecidos em comparação aos outros gatos tratados. Níveis de enzima elevados foram detectados em torno do ponto de cateterização seguindo-se à última dose, enquanto que níveis baixos foram vistos no membro contra-lateral. Essas 20 constatações sugerem que o cateter tinha se desalojado prematuramente e tinha contribuído para os baixos níveis de ASB vistos nos tecidos desse animal. A comparação das atividades de enzimas nos três gatos restantes mostrou atividade de enzima aumentada no fígado, pulmão, rim, 25 cérebro e cerebelo, e atividade reduzida nos nódulos linfáticos mesentéricos do gato de infusão de duas horas, com relação aos animais de infusão de 10 minutos. Nenhuma enzima foi encontrada na pele, cartilagem e córnea. Embora os dados a partir desse estudo sejam limitados, as 30 constatações a partir desse estudo sugerem que as infusões de duas horas podem resultar em níveis de enzima aumentados nos tecidos (além do fígado) com relação às infusões de 10

minutos, indicando que as infusões estendidas fornecem melhor distribuição nos tecidos.

#### EXEMPLO 9

##### Método de Preparação e de Purificação (Processo de 5 Perfusão)

Um fluxograma de processo comparando o processo de purificação para os processos de cultivo de células em batelada alimentada e com base em perfusão é fornecido na Tabela 14. Comparações com relação ao processo de purificação de batelada alimentada, assim como detalhes das mudanças específicas implementadas para a purificação do material do processo de perfusão, estão resumidos na Tabela 15. A Tabela 16 retrata o método de purificação usado para as culturas de células com base em perfusão.

15 **Tabela 14: Processo de Purificação; Comparação entre os  
Processos em Batelada e em Perfusão**

| Processo em Batelada                                 | Processo em Perfusão                                 |
|--|--|
| Filtração de Coleta                                  | Filtração de Coleta                                  |
| ↓  | ↓  |
| Concentração para 10 x e<br>Diafiltração             | Concentração para 20 x                               |
| ↓  | ↓  |
| Cromatografia em DEAE- Sepharose                     | Ajuste de pH e Filtração                             |
| ↓  | ↓  |
| Cromatografia em Blue- Sepharose FF                  | Cromatografia em Blue- Sepharose FF                  |
| ↓  | ↓  |
| Cromatografia em Cobre Quelante-<br>Sephadex G-25 FF | Cromatografia em Cobre Quelante-<br>Sephadex G-25 FF |
| ↓  | ↓  |
| Cromatografia em Fenil-Sepharose<br>HP               | Cromatografia em Fenil-Sepharose HP                  |
| ↓  | ↓  |
| Ultradiafiltração/Diafiltração                       | Ultradiafiltração/Diafiltração                       |
|  | Remoção de ADN                                       |
| Redução viral através de um filtro<br>de 0,04 µm     | Redução viral através de um filtro<br>de 0,02 µm     |

| Formulação   | Formulação com Polissorbato  |
|--|--|
| Filtro de 0,2 µm   | Filtro de 0,2 µm   |
| Substância de droga em volume formulada é armazenada até a liberação pelo CQ. Lotes de substância de droga em volume formulada que atendem às especificações de liberação podem ser reunidos nessa etapa | Substância de droga em volume formulada é armazenada até a liberação pelo CQ. Lotes de substância de droga em volume formulada que atendem às especificações de liberação podem ser reunidos nessa etapa |
| ↓  | ↓  |
| Substância de droga formulada liberada despachada para Hollister-Stier Laboratories para envazamento, enfrascamento e rotulagem  | Substância de droga formulada liberada despachada para Hollister-Stier Laboratories para envazamento, enfrascamento e rotulagem  |

Tabela 15: Sumário de Descrição de Mudanças de Purificação

| Etapa de Produção  | Descrição (Batelada)  | Descrição (Perfusão)  |
|--|---|---|
| PROCESSO DE PURIFICAÇÃO                                  |   |   |
| Concentração / Diafiltração                              | <p>Filtração de Escorrimento Tangencial: 2,8 m<sup>2</sup></p> <p>Filtros MWCO retentores de albumina</p> <p>Operação:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração para 10 x</li> <li>• Diafiltrado contra 5 volumes de fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 100 mM, pH 7,3</li> </ul>  | <p>Mudanças:</p> <p>Filtração de Escoamento Tangencial: 5,6 m<sup>2</sup></p> <p>Filtros MWCO retentores de albumina</p> <p>Operação:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração para 20 x</li> <li>• Nenhuma diafiltração, sistema enxaguado com fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3</li> </ul> <p>Objetivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução de volume para armazenamento à 4°C</li> </ul> |
| Cromatografia de percolação através de DEAE Sepharose FF | <p>Coluna: 2 x 30 cm de diâmetro x 33 cm de altura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Neutralização: fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3</li> <li>• Equilíbrio: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 100 mM, pH 7,3</li> <li>• Carga: coletado concentrado / diafiltrado</li> <li>• Lavagem: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 100 mM, pH 7,3</li> <li>• Esgotamento: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de</li> </ul> | Etapa eliminada   |

|                                    |   |   |
|------------------------------------|---|---|
|                                    | <p>sódio 1,5 M, pH 7,3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regeneração: ácido acético glacial à 10%</li> <li>• Lavagem: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 N</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 N</li> </ul>   |   |
|                                    | ↓   |   |
| Ajuste de pH e filtração           |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajuste de pH: adição de ácido acético glacial à 10% as amostras coletivas concentradas para 20 x até um pH final de 5,0</li> <li>• Carga: amostras coletivas concentradas para 20 x</li> <li>• Filtração através de filtros de clarificação e filtro de 0,2 µm</li> <li>• Jato: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 120 mM, pH 5,0</li> </ul> <p>Objetivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta a capacidade de ligação de rhASB da coluna de resina de Blue Sepharose</li> </ul>   |
|                                    | ↓   |   |
| Cromatografia em Blue Sepharose FF | <p>Coluna:</p> <p>20 cm de diâmetro x 11 cm de altura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Neutralização: acetato de sódio 1 M, pH 5,5</li> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,5</li> <li>• Carga: percolado de DEAE ajustado para acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,5</li> <li>• Lavagem: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,5</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, pH 5,5</li> <li>• Regeneração: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 5,5</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem 1: Água para injeção</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 1 M, pH 5,5</li> <li>• Armazenamento: Etanol à 20%</li> </ul> | <p>Mudança:</p> <p>Coluna:</p> <p>45 cm de diâmetro x 16 cm de altura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutralização: omitida</li> <li>• Equilíbrio: fosfato de sódio 10 mM, pH 6,45</li> <li>• Carga: amostras coletivas concentradas para 20 x, pH ajustado para 5,0 e filtrado</li> <li>• Lavagem: fosfato de sódio 10 mM, pH 6,45</li> <li>• Eluição: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 125 mM, pH 6,45</li> <li>• Regeneração: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 6,45</li> <li>• Lavagem 2: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 6,45</li> </ul> <p>Rationale:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Condições permitem a remoção aperfeiçoada de impurezas de CHO potenciais permitindo a eliminação de Cromatografia em DEAE Sepharose</li> </ul> |
|                                    | ↓   | Mudanças  |
| Cromatografia em                   |   |   |

|                                 |   |  |
|---------------------------------|---|--|
| Cobre Quelante<br>Sephadex FF   | <p>Coluna: 14 cm de diâmetro x 9 cm de altura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Tampão de carga: sulfato cítrico 0,1 M</li> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 6,0</li> <li>• Carga: Ajustar o teor de glicerol do eluato de Blue Sephadex para 10%, por adição de acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, glicerol à 50%, pH 6,0</li> <li>• Lavagem 1: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 6,0</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 4,0</li> <li>• Lavagem 3: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 3,8</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 3,6</li> <li>• Regeneração: EDTA 50 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 8,0</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 M</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 N</li> </ul> <p>↓</p> | <p>Coluna: 40 cm de diâmetro x 16 cm de altura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 5,5</li> <li>• Carga: Ajustar o teor de glicerol do eluato de Blue Sephadex reunido para 10%, por adição de acetato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 2,0 M, glicerol à 50%, pH 5,2</li> <li>• Lavagem 1: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 5,5</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 3,9</li> <li>• Lavagem 3: omitida</li> </ul> <p>Rationale:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pureza de produto consistente e reproduzível obtida com etapa modificada</li> </ul> |
| Inativação Viral                | Frações de eluatos reunidas mantidas durante 30 a 120 minutos antes do ajuste para pH 4,5 com NaOH 0,5 M  | Nenhuma mudança  |
| Cromatografia em Fenil-Sephadex | <p>Coluna: 10 cm de diâmetro x 16 cm de altura</p> <p>Resina: Fenil-Sephadex de Alto Desempenho</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 3,0 M, pH 4,5</li> <li>• Carga: Ajustar o teor de cloreto de sódio do eluato</li> </ul> <p>↓</p>   | <p>Mudança:</p> <p>40 cm de diâmetro x 16 cm de altura</p> <p>Resina: Fenil-Sephadex "High Sub Fast Flow"</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 4,5</li> <li>• Carga: Ajustar o teor de cloreto de sódio do eluato</li> </ul>  |

|                 |   |   |
|-----------------|---|---|
|                 | <p>de Cobre para 3 M, por adição de acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 5 M, pH 4,5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem 1: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 3,0 M, pH 4,5</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 1,6 M, pH 4,5</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 1 M, pH 4,5</li> <li>• Regeneração: acetato de sódio 20 mM, pH 4,5</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 N</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 N</li> </ul> | <p>de Cobre para 2 M, por adição de acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 5 M, pH 4,5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem 1: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 7,1</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 4,5</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 250 mM, pH 4,5</li> </ul> <p><i>Rationale:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alternar resina tem características de escoamento mais favoráveis e capacidade em relação à rhASB</li> <li>• Lavagem 1 permite eliminação mais robusta de impurezas de proteína potenciais</li> </ul> |
| UF/DF Final     | <p>↓</p> <p>Filtração de Escoamento Tangencial: Filtros MWCO 10 KDa &lt; 0,4 m<sup>2</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equilíbrio: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> <li>• Concentração: Concentração para NMT 1,5 mg/mL</li> <li>• Diafiltração: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> </ul>  | <p>Mudança:</p> <p>Filtração de Escoamento Tangencial: Filtros MWCO 10 KDa de 2,8 m<sup>2</sup></p>   |
| Remoção de ADN  | <p>↓</p> <p>Não Realizada</p>   | <p>Nova Etapa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtração de ADN: Produto filtrado através de um filtro de ADN com base em troca iônica</li> </ul> <p>Objetivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminação de ADN adicional para compensar a eliminação da etapa de Cromatografia percolante por DEAE</li> </ul>   |
| Formulação      | <p>↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diluído para 1,0 mg/mL com fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> </ul>   |   |
| Filtração Viral | <p>↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtração Viral: Produto filtrado através de um filtro de 0,04 µm</li> </ul>  | <p>Mudança:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtração Viral: Produto filtrado através de um filtro de 0,02 µm</li> </ul> <p>Objetivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de tamanho de poros menor para intensificar a eliminação viral</li> </ul>   |

|            |   |   |
|------------|---|---|
| ↓          |   |   |
| Formulação | Etapa ocorre mais cedo no processo<br>(Antes da filtração viral)  | Mudança:<br>• Diluída para 1,0 mg/mL com fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8<br>• Formulação: Polissorbato 80 é adicionado a uma concentração de 50 µg/mL |
| ↓          |   |   |
| Filtração  | • Filtração: Filtrar o produto diluído através de um filtro de 0,2 µm para um recipiente de armazenamento | Nenhuma Mudança   |

**Tabela 16: Método de Purificação de rhASB (Processo de Perfusão)**

| Etapa   | Processo   |
|---|--|
| Filtração de Coleta                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtração através de filtros de clarificação, filtros de 0,45 µm e, finalmente, filtro de 0,2 µm</li> <li>• Filtrados de amostras coletivas são armazenados em bolsas de polipropileno</li> </ul>   |
| Concentração de UF                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equilíbrio e jato: fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3</li> <li>• Carga: fluido de coleta filtrado</li> <li>• Concentração: Concentração para 20 x</li> <li>• Filtração: Filtrar o produto diluído através de um filtro de 0,2 µm para recipiente de armazenamento</li> </ul>   |
| Ajuste de pH e filtração                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ajuste de pH: Adicionar ácido acético glacial à 10% nas amostras coletivas concentradas para 20 x até um pH final de 5,0</li> <li>• Carga: amostras coletivas concentradas para 20 x</li> <li>• Enxágue: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Filtração através de clarificação e filtro de 0,2 µm</li> <li>• Jato: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 120 mM, pH 5,0</li> </ul>  |
| Blue Sepharose 6 FF (Blue, Blue-Sepharose)        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: água para injeção (WFI)</li> <li>• Equilíbrio: fosfato de sódio 10 mM, pH 6,45</li> <li>• Carga: filtrados de amostras coletivas concentradas para 20 x e com pH ajustado</li> <li>• Lavagem: fosfato de sódio 10 mM, pH 6,45</li> <li>• Eluição: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 125 mM, pH 6,45</li> <li>• Regeneração: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 6,45</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem 1: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Lavagem 2: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 6,45</li> <li>• Armazenamento: Etanol à 20%</li> </ul> |
| Sepharose FF Quelante (Cobre, CC, Cobre-Quelante) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: água para injeção (WFI)</li> <li>• Tampão de carga: sulfato cíprico 0,1 M</li> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 5,5</li> <li>• Carga: Ajustar o teor de glicerol das amostras coletivas de eluatos de Bluel-Sepharose para 10%, por adição de acetato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 2,0 M, glicerol à 50%, pH 5,2</li> <li>• Lavagem 1: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 5,5</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 5,5</li> </ul>  |

|   |  |
|---|--|
|   | <p>M, glicerol à 10%, pH 3,9<br/>     Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 0,5 M, glicerol à 10%, pH 3,6</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eluato mantido durante 30 a 120 minutos antes do ajuste do pH para 4,5 com NaOH 0,5 M</li> <li>• Regeneração: EDTA 50 mM, cloreto de sódio 1,0 M, pH 8,0</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 M</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 M</li> </ul>   |
| Fenil<br>Sepharose 6<br>FF "High Sub"                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-lavagem: hidróxido de sódio 0,1 N</li> <li>• Lavagem: Água para injeção (WFI)</li> <li>• Equilíbrio: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 4,5</li> <li>• Carga: Ajustar o teor de cloreto de sódio do eluato de Cobre Quelante-Sepharose para 2 M, por adição de acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 5 M, pH 4,5</li> <li>• Lavagem 1: acetato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 7,1</li> <li>• Lavagem 2: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 2,0 M, pH 4,5</li> <li>• Eluição: acetato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 250 mM, pH 4,5</li> <li>• Regeneração: acetato de sódio 20 mM, pH 4,5</li> <li>• Sanitização: hidróxido de sódio 0,5 N</li> <li>• Armazenamento: hidróxido de sódio 0,1 N</li> </ul> |
| UF/DF,<br>Filtração de<br>ADN,<br>Filtração<br>Viral,<br>Formulação | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equilíbrio: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> <li>• Concentração: Concentração para NMT 1,5 mg/mL</li> <li>• Diafiltração: fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8</li> <li>• Filtração de ADN: Produto filtrado através de um filtro de ADN</li> <li>• Filtração Viral / Diluição: Produto filtrado através de um filtro de 0,02 µm e diluído para 1,0 mg/mL</li> <li>• Formulação: Polissorbato 80 em uma concentração de 50 µg/mL é adicionado</li> <li>• Filtração: Filtrar o produto diluído através de um filtro de 0,2 µm para recipiente de armazenamento</li> </ul>   |

Todas as colunas de purificação são regeneradas antes de usar, sanitizadas depois de uso e armazenadas nos tampões apropriados conforme indicado nas Tabelas 15 e 16.

#### Purificação das Matérias-Primas

5 Todos os materiais são fornecidos por vendedores qualificados.

**Tabela 17: Matérias-Primas para Purificação**

| Ingrediente                                 | Grau          |
|---|---------------|
| Ácido Acético Glacial                       | USP           |
| Sulfato Cúprico Penta-hidratado             | USP           |
| Edetato Dissódico                           | USP           |
| Álcool Desidratado, USP (Etanol, 200 Proof) | USP           |
| Glicerina                                   | USP           |
| Acetato de Sódio, Tri-hidratado             | USP           |
| Cloreto de Sódio                            | USP           |
| Solução de Hidróxido de Sódio a 50% p/p     | Grau Reagente |

|  |               |
|--|---------------|
| Fosfato de Sódio, Dibásico, Hepta-hidratado  | USP/EP        |
| Fosfato de Sódio, Monobásico, Mono-hidratado | USP           |
| Ácido Clorídrico, 6 N, Solução Volumétrica   | Grau Reagente |
| Polissorbato 80, MF/EP (CRILLE 4 EP)         | NF/EP         |
| Água para injeção, embalada a granel         | USP           |

- A glicerina a ser utilizada deve ser derivada de um processo sintético. Todas as matérias-primas usadas devem obedecer a última versão da Nota CPMP/CVMP para a Diretriz intitulada, "Minimizando o Risco de Transmissão de Agentes de Encefalopatia Espongiforme Animal Via Produtos de Medicina Humana e Veterinária", na qual derivados de sebo, tais como glicerol e ácidos graxos, manufaturados por rigorosos processos envolvendo elevadas temperaturas e condições de pressão ou reações químicas conhecidas como 5 sendo terminalmente hostis ao agente da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) são concebidas como sendo pouco provavelmente infecciosas. Portanto, o risco de transmissão de BSE a partir da glicerina é considerado como sendo 10 baixo.
- 15 A segurança viral de rhASB é confirmada por uma combinação de seleção e quantificação de vendedores, testagem de matérias-primas, estudos de caracterização de bancos de células, estudos de remoção viral e capacidade de inativação dos processos de purificação de rhASB, e 20 testagem de liberação de lotes de rotina. Os regulamentos e diretrizes norte-americanos, europeus e da ICH foram observados para assegurar a segurança viral de rhASB.

**Cromatografia em Coluna, Remoção de ADN e Filtração Viral**

- 25 rhASB é, agora, purificada usando-se uma série de etapas de cromatografia e de filtração. O fluido coletado é concentrado para 20 x por ultrafiltração, o pH é ajustado, filtrado e carregado em uma coluna de cromatografia de Blue Sepharose "Fast Flow" (45 cm x 16 cm). O eluado de Blue

Sepharose "Fast Flow" é filtrado antes do carregamentos em uma coluna de Cobre Quelante Sepharose. O eluato de Cobre é filtrado antes do carregamento em uma coluna Fenil Sepharose "Fast Flow High Sub". Todas as três etapas de 5 purificação em coluna cromatográfica são realizadas em ligação e em um modo de eluato. O eluato da coluna de Fenil Sepharose é passado através de um filtro de troca iônica e de filtro de redução viral antes da concentração e da troca de tampão por ultrafiltração.

10 **Estudos de Remoção Viral / Inativação**

Dois estudos foram conduzidos para avaliar a capacidade de redução viral do processo de purificação de rhASB modificado. Os estudos foram realizados em BioReliance (Rockville, MD), usando dois sistemas de vírus 15 modelo, vírus de leucemia murina xenotrópica (XMuLV) e vírus de minuto murino (MMV). XMuLV é um retrovírus de ARN de fita única envelopado com baixa resistência à inativação físico-química. MMV é um vírus de ADN de fita única não envelopado, pequeno, com elevada resistência a agentes 20 físicos-químicos.

Esses estudos avaliaram duas etapas cromatográficas (Cobre Quelante Sepharose FF e Fenil Sepharose FF "High Sub") e o filtro viral (0,02 µm) usado no processo de purificação de rhASB. Estudos de bloqueio e de recuperação 25 foram realizados usando-se versões em menor escala das etapas de processo. Os parâmetros críticos mantidos foram tempos de retenção e interações de matriz-solução. Isso foi conseguido replicando-se os tampões, taxas de escoamento linear e alturas das colunas, mas, ajustando-se o diâmetro 30 das colunas. Os materiais usados no estudo (produto e tampões) foram coletados a partir da produção real em escala completa.

As colunas de cromatografia (Cobre Quelante senharose e Fenil Sepharose) foram empacotadas e pré-corridas cada uma com as cargas (branco) de rhASB típicas ou cargas bloqueadas com tampão viral antes de envio a BioReliance.

- 5 Os cromatogramas e os rendimentos em produto na presença de tampões virais foram comparáveis às corridas com brancos. Cargas de coluna idênticas foram bloqueadas cada uma com XMuLV ou MMV, imediatamente antes da cromatografia. A quantidade de redução viral para cada uma das etapas 10 avaliadas foi determinada por comparação à carga viral nas cargas de coluna e eluatos. Um sumário dos resultados para esse estudo é mostrado na Tabela 18.

**Tabela 18: Fatores de Redução pra XMuLV e MMV**

| Etapa de Processo                         | log da Redução de XMuLV | log da Redução de MMV |
|---|-------------------------|-----------------------|
| Blue Sepharose                            | Não testada             | Não testada           |
| Cobre Quelante<br>(mantido pH mais baixo) | $\geq 3,51 \pm 0,52$    | $\geq 2,71 \pm 0,52$  |
| Fenil Sepharose                           | $\geq 3,54 \pm 0,36$    | $\geq 1,72 \pm 0,64$  |
| Filtração de ADN                          | Não testada             | Não testada           |
| Filtração Viral                           | $\geq 5,51 \pm 0,43$    | $\geq 4,76 \pm 0,00$  |
| log Redução Total                         | $\geq 12,56$            | $\geq 9,19$           |

### 15 Testagem no Processo

A testagem no processo é realizada ao longo de todo o processo e está ilustrada na Figura 3. A testagem no processo do fluido de cultura de células coletado e dos intermediários de purificação está descrita nas Tabelas 19 20 e 20.

**Tabela 19: Testagem no Processo do Fluido de Cultura de Células Coletado**

| Teste                                   | Níveis de Ação                   |
|---|----------------------------------|
| Endotoxina Bacteriana por LAL (USP/EP)  | $\geq 2$ EU/mL                   |
| Carga Biológica (USP/EP)                | $\geq 1$ cfu/10 mL               |
| Proteína Total por Bradford e Atividade | Resultados usados para o cálculo |

|   |  |
|---|--|
|   | da carga da coluna de Blue Sepharose     |
| Micoplasma <sup>1</sup>   | Negativo<br>(Especificação de liberação) |
| Teste <i>in vitro</i> com relação à presença de contaminantes virais <sup>1</sup> | Negativo<br>(Especificação de liberação) |

<sup>1</sup>A amostragem é realizada em múltiplos pontos de tempo durante o estágio de fabricação de coleta de cultura de células. A última amostra removida antes do término do processo de cultura de células é testada e um resultado negativo é necessário para a liberação do lote.

5      **Tabela 20: Testagem no Processo de Intermediários de Purificação**

| Teste  | Níveis de Ação  |
|--|---|
| Endotoxina Bacteriana por LAL (USP/EP)           | $\geq 3$ EU/mL em eluatos de coluna <sup>1</sup>  |
| Carga Biológica (USP/EP)                         | $\geq 20$ cfu/mL de pré-filtrado <sup>1</sup><br>$\geq 1$ cfu/100 mL em Substância de Drogas a Granel Formulada (FBDS) <sup>2</sup> |
| Atividade  | Resultado usado para o cálculo das cargas das colunas de Cobre Quelante e de Fenil Sepharose  |
| Proteína Total por Espectrofotometria UV-Visível | Resultado usado para o cálculo da concentração de proteína para UF/DF   |

<sup>1</sup>Resultados excedendo níveis de ação são investigados por procedimentos de operação padrão.

<sup>2</sup>Se os resultados excederem o nível de ação, a FBDS será filtrada em 0,2  $\mu$ m para recipientes de armazenamento estéreis apropriados e, então, a liberação pendente de quarentena para envio para os locais de enchimento.

**Resultados do método de perfusão de purificação de precursora de rhASB**

15      A Tabela 21 fornece dados sobre o grau de pureza de rhASB obtida usando-se os métodos de purificação descritos nas Tabelas 15 e 16. A coluna "Pureza por RP-HPLC" indica o grau de pureza obtido para a quantidade combinada de formas tanto precursora quanto madura de rhASB.

20

**Tabela 21: Resultados de Liberação de Lotes de rhASB**

| Lote    | Pureza por RP-HPLC | Presença das formas processadas* | Processo de Fabricação |
|---------|--------------------|----------------------------------|------------------------|
| AP60028 | 99,6               | -                                | Processo em batelada   |
| AP60029 | 98,8               | +                                | Processo em batelada   |
| AP60030 | 98,7               | +                                | Processo em batelada   |

|         |      |    |                      |
|---------|------|----|----------------------|
| AP60031 | 99,1 | -  | Processo em batelada |
| AP60032 | 99,8 | -  | Processo em batelada |
| AP60033 | 99,4 | -  | Processo em batelada |
| AP60035 | 98,7 | -  | Processo em batelada |
| AP60036 | 99,4 | -  | Processo em batelada |
| AP60038 | 99,6 | -  | Processo em batelada |
| AP60039 | 99,3 | -  | Processo em batelada |
| AP60040 | 99,1 | -  | Processo em batelada |
| AP60101 | 99,3 | -  | Processo em batelada |
| AP60102 | 98,9 | -  | Processo em batelada |
| AP60103 | 99,0 | -  | Processo em batelada |
| AP60104 | 99,0 | +  | Processo em batelada |
| AP60105 | 99,0 | -  | Processo em batelada |
| AP60106 | 99,2 | -  | Processo em batelada |
| AP60107 | 99,4 | -- | Processo em batelada |
| AP60108 | 99,7 | -  | Processo em perfusão |
| AP60109 | 99,8 | -  | Processo em perfusão |
| AP60201 | 99,0 | ND | Processo em perfusão |
| AP60202 | 100  | -  | Processo em perfusão |

“+” indica a presença das formas processadas (estimada em 1 a 15%) na substância de droga a granel formulada; “-” indica a ausência das formas processadas.

As Figuras 4A - 4C fornecem os cromatogramas representativos das três etapas cromatográficas do método em perfusão de purificação (Tabela 16). A Tabela 22 fornece as recuperações médias de rhASB precursora para cada uma dessas três etapas cromatográficas. A Figura 5 fornece os dados com relação à análise de pureza de amostras no processo em cada etapa cromatográfica e do produto final purificado (rhASB precursora).

**Tabela 22: Sumário de Recuperações de Purificação**

| Etapa                              | Recuperação Média (%) |
|------------------------------------|-----------------------|
| Ajuste de pH 5,0                   | 83                    |
| Coluna de Blue Sepharose           | 84                    |
| Coluna de Cobre Quelante Sepharose | 86                    |
| Transição de Cobre para Fenil      | 86                    |
| Coluna de Fenil Sepharose          | 88                    |
| Global                             | 50                    |

Quando os produtos purificados, obtidos usando-se o processo em batelada e o processo em perfusão, são comparados, o processo em perfusão claramente produz uma precursora de rhASB mais puro. Mesmo tentativas para 5 otimizar adicionalmente o processo em batelada, por seleção de diferentes frações de lavagem ou por variação das condições, não resultou no produto consistentemente puro obtinível pelo processo em perfusão. O processo em perfusão é capaz de produzir pureza de precursora de rhASB 10 consistente de 99% ou mais, enquanto que o processo em batelada não o faz (Tabela 21). A Figura 6 fornece uma comparação entre os produtos obtidos usando-se antigo método em batelada, no qual a cultura de células é cultivada usando-se um meio que é suplementado com G418 e 15 não suplementado com ácido fólico, serina e asparagina (trilha 2), e os produtos purificados usando-se o processo em perfusão (trilhas 3 a 9). As amostras de rhASB foram desnaturadas em SDS com um agente redutor e submetidas à eletroforese através de PAGE à 4 - 20% em tampão correndo 20 em SDS. Os produtos purificados no processo em batelada claramente contêm muito mais impurezas (especialmente próximas ao tamanho de 48 KDa), do que os produtos purificados pelo processo em perfusão. Na rhASB de processo em batelada, aparecem quantidades detectáveis de formas 25 processadas (estimadas em 1 a 15%) (trilha 2). Os lotes de processo em perfusão são altamente comparáveis àqueles outros e são significativamente menos complexos do que o padrão de rhASB purificado pelo processo em batelada, indicando um grau de pureza mais elevado para o material de 30 processo em perfusão.

A Tabela 23 fornece pureza percentual de precursora de rhASB purificada usando o método de purificação por processo em perfusão.

**Tabela 23: Pureza do Produto Final**

| Lote             | Pureza por RP-HPLC<br>(% pico principal) |
|------------------|--|
| AC60109 UF # 4   | 99,8                                     |
| AC60109 UF # 10  | 99,6                                     |
| AC60109 UF # 1   | 99,7                                     |
| AC60109 UF # 18  | 99,9                                     |
| AC60109A UF # 22 | 99,7                                     |
| AC60109A UF # 25 | 99,8                                     |
| AC60109A UF 27#  | 100                                      |
| AC60109          | 99,8                                     |
| Fabricação BMK   |  |
| AC60202 UF # 4   | ND                                       |
| AC60202 UF # 10  | ND                                       |
| AC60202 UF # 18  | ND                                       |
| AC60202          | 100                                      |
| Fabricação BMK   |  |
| Média            | 99,8                                     |

ND = não determinado

A Tabela 24 fornece a pureza percentual de lotes de precursora de rhASB purificada usando-se o método de purificação de processo em perfusão, onde a pureza foi avaliada por RP-HPLC e SEC-HPLC (que permite a quantificação de impurezas de diferentes pesos moleculares, tais como formas processadas ou multimeros).

10

**Tabela 24: Pureza por RP-HPLC e SEC-HPLC**

| Lote    | Pureza por RP-HPLC<br>(% do pico principal) | Pureza por SEC-HPLC<br>(% do pico principal) |
|---------|---|--|
| AP60109 | 99,8  | 99,8   |
| AP60202 | 100   | > 99   |
| AP60204 | 99,7  | 99,8   |
| AP60206 | 100   | 99,8   |
| AP60301 | 100   | 99,6   |
| AP60302 | 100   | 99,6   |
| AP60303 | 100   | 99,5   |
| AP60304 | 100   | ND   |
| Média   | 99,9  | 99,6   |

\* Não determinado

**Remoção de protease no Processo em Perfusion**

Na escala de batelada de 180 L, duas corridas relativamente grandes de 24 L de DEAE-Sepharose são necessárias por lote. O processo em perfusão gera volumes 5 de coletado 10 vezes maiores, os quais impõem severos tamanhos de colunas de DEAE-Sepharose e volumes de tampões impraticáveis para purificação em grande escala prática. Portanto, a eliminação da etapa de DEAE-Sepharose particularmente inatingível foi avaliada em um esforço de 10 se delinear o novo trem de purificação em perfusão. Como uma consequência, o trem de três colunas (conforme descrito na Tabela 16) supera esse obstáculo de produção em grande escala.

A etapa de cromatografia em DEAE-Sepharose no processo 15 em batelada (descrita na Tabela 15) foi empregada primariamente para remover proteína total (incluindo protease) e o corante de indicador de pH, Vermelho de fenol. A última questão é abordada no novo processo por remoção do Vermelho de Fenol da formulação dos meios 302. A 20 remoção de proteína total pela etapa de DEAE-Sepharose resultou em mais elevada capacidade de Blue-Sepharose em pH 5,5. No processo novo, as condições de Blue-Sepharose necessitaram ser identificadas, que balancearam elevada capacidade de rhASB, enquanto limitando a atividade de 25 protease. Tanto a capacidade quanto a proteólise são intensificadas em baixo pH. Além disso, a eliminação de proteases deve ser demonstrável para melhorar a robustez da etapa subsequente de cromatografia em cobre, em que a 30 eliminação da protease, catepsina, tem sido problemática no processo em batelada. Foram encontradas condições que renderam os resultados desejados, por meio dos quais o carregamento foi realizado em baixo pH, enquanto que as condições de lavagem e de eluição ocorriam em pH mais

elevado, condições que eliminam eficientemente a protease, catepsina, com uma carga aceitável de 0,8 mg de rhASB / mL de resina. A remoção da atividade de protease (por exemplo, catepsina) é demonstrada nos cromatogramas da Figura 8.

5       A comparação de rhASB purificada a partir de corrida de perfusão, 102PD0055, usando ou o novo processo (sem cromatografia DEAE FT) ou o antigo processo de purificação em batelada (eluato PS (OP)), indica que o material do processo antigo purificado (usando o método em batelada) a 10 partir da mesma corrida de reator, trilha de eluato PS (OP), tem significativamente mais proteólise, conforme demonstrado pelas bandas adicionais sobre gel tingido por prata e detectáveis por anticorpos anti-ASB (ver a Figura 9). O novo processo é muito mais puro com relação ao padrão 15 em batelada. A protease catepsina é eliminada por cromatografia em Blue-Sepharose. O material de reação cruzada de anti-catepsina é visto na fração de fita de Blue-Sepharose usando o novo processo.

20     Os resultados farmacocinéticos descritos abaixo no Exemplo 11 mostram que a preparação de rhASB mais pura resulta em uma meia-vida mais longa do que o padrão em batelada prévio.

#### **EXEMPLO 10**

##### **Efeitos Tensioativos sobre a Formação de Partícula**

25     Um protocolo experimental foi realizado para determinar o efeito de Polissorbato 80 sobre a geração de partículas em frascos de rhASB feitos com o novo processo de cultura de células em perfusão. Ensaios de contagem visuais e de partículas foram empregados para determinar a 30 extensão da geração de partículas. Além disso, a testagem de atividade, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), o imunotintimento e a cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foram realizados para confirmar a qualidade

de produto na presença de Polissorbato 80 e/ou agitação relativa a controles não tratados. Frascos e rolhas usados para o processo em batelada de rhASB (antigo, Wheaton 5mL, 2905-B24B/West S-127 (4401/45)) foram também comparados aos 5 frascos e às rolhas propostos a serem usados para o material derivado de perfusão (novo, Wheaton 5 mL, 2905-B8BA/West S-127 (4432/50)).

Os frascos foram enchidos, depois da rhASB ter sido passada através de um filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ , usando uma pipeta 10 descartável de 10 mL. Dois frascos contendo rhASB foram enchidos para cada teste. Ambos foram usados para o ensaio visual, com um dedicado para contagem de partículas e o outro guardado para o restante dos ensaios. Somente um frasco de controle de tampão / teste foi enchido. Poucas 15 partículas foram introduzidas devido ao ajuste, manuseio de amostra, filtração e enchimento. A partir de análise de contagem visual e de partículas (resultados mostrados nas tabelas 25A-C e 26A-C abaixo), nos dias 0, 1 e 14 dias, não foi detectada formação de partículas significativas nos 20 frascos não agitados de droga formulada, com relação aos controles contendo somente tampão.

Depois de 18 horas de agitação à 4°C, um grande aumento em partículas foi observado em ambas as configurações de frascos com rhASB em formulação somente 25 com tampão (fosfato de sódio 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 5,8), sem Polissorbato. Flocos finos eram claramente visíveis.

A contagem de partículas foi feita usando-se o contador de partículas HIAC/ROYCO Modelo 9703. O contador 30 de partículas líquidas é capaz de dimensionar e contar partículas variando desde 2,0  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$ . Três aliquotas, de não menos do que 5 mL cada uma, são colocadas no sensor de obscuração de luz. As contagens de partículas médias

desde as corridas 2 e 3 são relatadas como contagens de partículas por mL. Com base em quantificação de HIAC-Royko de partículas de 10  $\mu\text{m}$  de tamanho, 2.069 e 1.190 partículas/mL foram contadas na antiga e na nova configuração de frascos, respectivamente. Na presença de Polissorbato 80 à 0,001%, observou-se uma contagem marcadamente mais baixa com 21 e 49 partículas/mL. Em Polissorbato 80 à 0,005%, não pôde ser detectada essencialmente diferença entre frascos agitados e não agitados.

Em antigos frascos / selos sem Polissorbato 80, houve uma queda inesperada em contagens de partículas/mL de 2.069 para 268 desde os dias 1 a 14 dias depois da agitação. O ensaio visual indicou flocos maiores nos mesmos frascos de 14 dias, nos quais contagens mais baixas foram encontradas; é possível que partículas maiores interferiram com o ensaio de HIAC-Royko, ou que a antiga configuração de frasco contribui para aumentar a formação de partículas com eventual coalescência e agregação para formar partículas maiores, embora em menor número.

Testagem adicional foi feita para confirmar a integridade da proteína após a agitação. A atividade específica não se modificou. A cromatografia por exclusão de tamanho, um método que pode detectar mudanças na agregação de proteínas, a qual poderia ser influenciada por agitação mecânica, mostrou um aumento nas espécies de maior peso molecular. A fim de detectar produtos de decomposição, géis de SDS-PAGE de rhASB foram ou tingidos com prata ou transferidos sobre nitrocelulose e tingidos com anticorpo anti-rhASB. Nenhuma banda adicional foi detectada em qualquer das amostras.

**Tabela 25 A. Ensaio Visual. Dia 0.**

| Frasco | [Polissorbato 80]<br>(%) | 102PD0089-01 |     | Tampão       |     |
|--------|--------------------------|--------------|-----|--------------|-----|
|        |                          | Sem agitação |     | Sem agitação |     |
| Antigo | 0                        | (-)          | (-) | (-)          | (-) |
| Antigo | 0,005                    | (-)          | (-) | (-)          | (-) |
| Antigo | 0,001                    | (-)          | (-) | (-)          | (-) |
| Novo   | 0                        | (-)          | (-) | (-)          | (-) |
| Novo   | 0,005                    | (-)          | (-) | (-)          | (-) |
| Novo   | 0,001                    | (-)          | (-) | (-)          | (-) |

**Tabela 25 B. Ensaio Visual. Dia 1.**

| Frasco | [Polissorbato<br>80]<br>(%) | 102PD0089-01 |              | Tampão       |                     |
|--------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------|
|        |                             | Agitação     | Sem agitação | Agitaç<br>ão | Sem<br>agita<br>ção |
| Antigo | 0                           | (++)         | (++)         | (-)          | (-)                 |
| Antigo | 0,005                       | (-)          | (-)          | (-)          | (-)                 |
| Antigo | 0,001                       | (+/-)        | (-)          | (-)          | (-)                 |
| Novo   | 0                           | (++)         | (++)         | (+/-)        | (-)                 |
| Novo   | 0,005                       | (-)          | (-)          | (-)          | (-)                 |
| Novo   | 0,001                       | (+/-)        | (-)          | (+/-)        | (-)                 |

5

**Tabela 25 C. Ensaio Visual. Dia 14.**

| Frasco | [Polissorbato 80]<br>(%) | 102PD0089-01 |                 | Tampão   |                 |
|--------|--------------------------|--------------|-----------------|----------|-----------------|
|        |                          | Agitação     | Sem<br>agitação | Agitação | Sem<br>agitação |
| Antigo | 0                        | (+++)        | (+++)           | (-)      | (-)             |
| Antigo | 0,005                    | (-)          | (-)             | (-)      | (-)             |
| Antigo | 0,001                    | (+/-)        | (+)             | (-)      | (-)             |
| Novo   | 0                        | (++)         | (++)            | (+/-)    | (-)             |
| Novo   | 0,005                    | (-)          | (-)             | (-)      | (-)             |
| Novo   | 0,001                    | (+/-)        | (-)             | (+/-)    | (-)             |

Ensaio visual:

Nenhuma precipitação visível: -

Linha limítrofe, incerteza sobre a precipitação: +/-

Pequena quantidade de precipitado fino: +

Precipitação significativa, nebuloso: ++

Muito nebuloso, flocos grandes de precipitado: +++

10

**Tabela 26 A. Análise de Particulados, HIAC-Royko  
(partículas/mL). Dia 0.**

| Frasco | [Polissorbato<br>80]<br>(%) | 102PD0089-01 |       |       |       | Tampão       |  |
|--------|-----------------------------|--------------|-------|-------|-------|--------------|--|
|        |                             | Sem agitação |       |       |       | Sem agitação |  |
|        |                             | 10 µm        | 25 µm | 10 µm | 25 µm |              |  |
| Antigo | 0                           | 4,5          | 0,5   | 2,5   | 0,0   |              |  |
| Antigo | 0,005                       | 2,0          | 0,5   | 1,5   | 0,0   |              |  |
| Antigo | 0,001                       | 4,5          | 1,5   | 2,5   | 1,0   |              |  |
| Novo   | 0                           | 6,5          | 2,5   | 6,0   | 4,0   |              |  |
| Novo   | 0,005                       | 1,5          | 0,5   | 3,0   | 1,0   |              |  |
| Novo   | 0,001                       | 19,5         | 5,0   | 2,0   | 0,0   |              |  |

**Tabela 26 B. Análise de Particulados, HIAC-Royko  
(partículas/mL). Dia 1.**

| Frasco | [Polissorbato<br>80]<br>(%) | 102PD0089-01 |       |              |       | Tampão   |     |              |     |
|--------|-----------------------------|--------------|-------|--------------|-------|----------|-----|--------------|-----|
|        |                             | Agitação     |       | Sem agitação |       | Agitação |     | Sem agitação |     |
|        |                             | 10 µm        | 25 µm | 10 µm        | 25 µm | 10       | 25  | 10           | 25  |
| Antigo | 0                           | 2.069,0      | 74,5  | 3,0          | 0,5   | 0,5      | 0,5 | 2,5          | 2,0 |
| Antigo | 0,005                       | 3,5          | 0,0   | 2,0          | 0,5   | 3,5      | 2,5 | 1,0          | 0,5 |
| Antigo | 0,001                       | 21,5         | 2,5   | 2,0          | 1,0   | 2,5      | 1,0 | 1,5          | 1,5 |
| Novo   | 0                           | 1.190,0      | 34,5  | 5,0          | 0,5   | 0,0      | 0,5 | 2,5          | 3,5 |
| Novo   | 0,005                       | 19,0         | 0,0   | 4,5          | 0,0   | 2,5      | 0,0 | 17,0         | 0,0 |
| Novo   | 0,001                       | 49,0         | 0,5   | 9,0          | 2,5   | 9,5      | 0,5 | 6,0          | 1,0 |

**Tabela 26 C. Análise de Particulados, HIAC-Royko  
(partículas/mL). Dia 14.**

| Frasco | [Polissorbato<br>80]<br>(%) | 102PD0089-01 |       |              |       | Tampão   |       |              |       |
|--------|-----------------------------|--------------|-------|--------------|-------|----------|-------|--------------|-------|
|        |                             | Agitação     |       | Sem agitação |       | Agitação |       | Sem agitação |       |
|        |                             | 10 µm        | 25 µm | 10 µm        | 25 µm | 10 µm    | 25 µm | 10 µm        | 25 µm |
| Antigo | 0                           | 268,0        | 18,0  | 0,5          | 0,0   | 4,5      | 2,0   | 0,0          | 0,5   |

|        |       |         |      |      |     |      |     |      |     |
|--------|-------|---------|------|------|-----|------|-----|------|-----|
| Antigo | 0,005 | 2,0     | 2,5  | 1,0  | 1,0 | 2,5  | 0,5 | 6,8  | 3,0 |
| Antigo | 0,001 | 72,0    | 6,5  | 7,0  | 3,0 | 7,0  | 1,0 | 1,0  | 2,0 |
| Novo   | 0     | 1.335,0 | 29,0 | 2,0  | 0,0 | 1,5  | 0,0 | 1,5  | 0,5 |
| Novo   | 0,005 | 7,0     | 0,5  | 16,0 | 0,0 | 13,5 | 0,0 | 13,0 | 2,0 |
| Novo   | 0,001 | 38,0    | 1,5  | 5,5  | 0,5 | 16,0 | 0,5 | 8,0  | 0,0 |

Os resultados indicaram que o procedimento de enchimento manual gera muito poucas partículas independentemente da formulação. Depois de agitação 5 constante e vigorosa à 180 rpm, partículas foram claramente visíveis em frascos contendo rhASB formulada sem Polissorbato 80.

A presença de Polissorbato 80 foi altamente eficaz inibir a formação de partículas mecanicamente induzida. A 10 proteção foi dramática, com contagens de partículas mantidas baixas em relação aos níveis de essencialmente de antecedentes em frascos agitados com 0,001% e 0,005% de Polissorbato 80. A concentração de 0,005% de Polissorbato 80 mostra leve melhoria na redução de contagens de 15 partículas com relação à concentração de 0,001% de Polissorbato 80.

Não se observou que a agitação ou a formulação causaram qualquer instabilidade de produto conforme avaliadas por atividade, concentração de proteína, pureza 20 ou agregação percentual.

#### **EXEMPLO 11**

##### **Estudo Clínico em Humanos**

Um teste clínico de duplo cego, aleatorizado, de fase 1/2, de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana recombinante 25 (rhASB) em pacientes com mucopolissacaridose VI (MPS VI), Síndrome de Maroteaux-Lamy, foi conduzida usando-se produto de droga produzido de acordo com o processo em batelada descrito aqui. A rhASB foi formulada em uma concentração de 1 mg/mL, pH 5,8, fosfato de sódio monobásico.1 H<sub>2</sub>O, 9 mM,

fosfato de sódio dibásico.7 H<sub>2</sub>O, 1 mM, cloreto de sódio 150 mM. Quando administrada a pacientes, a rhASB foi preparada por diluição da quantidade apropriada de solução de droga em uma bolsa intravenosa (i.v.) com salina normal, à 5 temperatura ambiente. Todos os pacientes foram pré-medicados com um anti-histamínico antes da infusão, para reduzir o potencial de reações associadas à infusão.

Os objetivos desse estudo eram avaliar a segurança, eficácia e perfil farmacocinético de duas doses de rhASB 10 como ERT, em pacientes com MPSVI. Os pacientes foram aleatorizados de uma maneira de duplo cego com relação a um dos dois grupos de dose, 0,2 a 1,0 mg/Kg. Deu-se a droga uma vez por semana como uma infusão de quatro horas. As medidas de segurança incluíram painel químico completo, 15 urinálise, contagem sanguínea completa (CBC) com diferencial, e rastreamento de AEs. A resposta imune e as reações associadas à infusão, ativação de complemento e formação de anticorpos são avaliadas para todos os pacientes. Os parâmetros de eficácia incluíram a tolerância 20 ao exercício / resistência física (teste de caminhada de 6 minutos), capacidade respiratória (teste de função pulmonar), amplitude de movimento de juntas (JROM), estado funcional (Questionário de Avaliação de Saúde Infantil [CHAQ]), níveis de GAG's urinários e mudanças de 25 hepatomegalia, acuidade visual, função cardíaca e apnéia do sono.

As avaliações foram conduzidas durante as infusões nas semanas 1, 2, 12, 24 e periodicamente depois disso para medir os níveis de antígeno (enzima) durante e depois da 30 infusão. As avaliações farmacocinéticas foram também conduzidas nas semanas 83, 84 e 96 da extensão de rótulo aberto do estudo, quando os pacientes foram trocados, começando na semana 84 com relação à rhASB purificada pelo

novo processo em perfusão em uma formulação com Polissorbato 80 à 0,005%.

Um total de sete pacientes foram arrolados, e incluiu-se pacientes com uma gama de características consistentes 5 com a doença avançando rapidamente ou moderadamente. Um paciente saiu do estudo na semana 3 por razões pessoais e foi substituído. Uma análise de intervalo pré-especificado foi conduzida seguindo o término de 24 semanas de tratamento para os seus pacientes restantes. Os dados a 10 partir da análise de intervalo de 24 semanas mostraram que a rhASB foi bem tolerada e que a dose de 1,0 mg/Kg pareceu produzir maior benefício clínico e ter um perfil de segurança comparável àquele da dose de 0,2 mg/Kg.

Aos pacientes no grupo de dose baixa ofereceu-se 15 tratamento continuado no nível de dose de 1,0 mg/Kg. Dois pacientes iniciaram a terapia no nível de dose mais elevado em intervalos depois da semana 48 (semanas 59 e 69). Os pacientes tratados até a semana 96 receberam a maioria das infusões de rhASB planejadas. Nenhum paciente perdeu mais 20 do que duas infusões totais durante esse período.

Avaliações de segurança realizadas durante as 24 semanas iniciais, das 48 semanas de tratamento, mostraram que o tratamento semanal com rhASB, em 0,2 ou 1,0 mg/Kg foi bem tolerada, sem diferenças significativas entre os dois 25 grupos de dose. O tratamento de prazo mais longo (até a semana 96) em 1,0 mg/Kg semanalmente, também foi bem tolerado.

Desenvolvimento e Níveis Complementares de Anticorpos Anti-  
rhASB

30 Todos os seis pacientes, na droga de estudo, na semana 30, desenvolveram anticorpos com relação à rhASB. Os níveis em quatro dos seis pacientes permaneceram relativamente baixos e declinaram a partir dos níveis de pico na semana

60. Dos dois pacientes que desenvolveram níveis mais elevados de anticorpos do que os outros quatro pacientes, os níveis de anticorpos de um paciente declinaram do nível de pico na semana 24, e os níveis do outro paciente caíram 5 rapidamente do nível de pico na semana 60. Nenhuma mudança consistente nos níveis complementares de CH50, C3 ou C4 foram observadas durante as 96 semanas de tratamento. Vários pacientes tiveram declínios intermitentes modestos nos níveis de CH50; entretanto, nenhuma evidência de 10 consumo complementar ou correlação entre esses baixos níveis e sintomas associados com a infusão foi observada. A Figura 10 mostra os níveis de anticorpos durante as 96 semanas de tratamento.

#### Glicosaminoglicanos Urinários

15 O nível de GAG's urinários é um marcador bioquímico do grau de armazenamento lisossomial em indivíduos afetados com MPS. Na semana 24, os GAG'S urinários foram reduzidos em uma média de 70% no grupo de dose elevada versus 55% no grupo de dose baixa. A porcentagem de DS, o produto de 20 armazenamento primário de MPS VI, foi similarmente diminuída em 44% e 18%, respectivamente. O exame do decorrer do tempo da mudança de excreção urinária de GAG's, como uma função de semanas de tratamento, mostrou uma queda mais pronunciada de GAG's urinários totais na semana 6, no 25 grupo de dose elevada. Esses dados confirmam que a dose mais elevada produziu uma mudança maior tanto em GAG's quanto em DS urinários. Os GAG's urinários continuaram a declinar até a semana 96 para os pacientes em ambos os grupos de tratamento, que permaneceram no estudo. A Figura 30 11 mostra a redução de níveis de GAG's urinários totais durante as 96 semanas, e a Figura 12 mostra uma comparação de níveis na semana 96 com relação aos níveis normais apropriados à idade. Observe-se que os dois pacientes no

grupo de dose de 0,2 mg/Kg, que permaneceram no estudo pacientes 41 e 45, passaram para o grupo de dose de 1,0 mg/Kg, nas semanas 69 e 59, respectivamente. Na semana 96, esses dois pacientes tiveram reduções em GAG's a partir da 5 seleção de 85% e 63%. Essas foram similares às reduções vistas em pacientes em 1,0 mg/Kg até o total de 96 semanas. Os pacientes 42, 43 e 44 tiveram reduções de 64%, 77% e 86% a partir da seleção, respectivamente. Em ambos os grupos, os pacientes que tiveram níveis de GAG's de linha de base 10 mais elevados tiveram reduções percentuais mais elevadas do que os pacientes com níveis de GAG's que estivessem mais próximos à faixa normal (< 5 vezes o limite superior de normal, isto é, média mais 2 SD).

#### Resistência Física

15 O teste de caminhada de 6 minutos serviu como a medida clínica primária de resistência física. Os dois pacientes incapazes de caminhar > 100 m na linha de base, que foram aleatorizados para receber 1,0 mg/Kg de droga de estudo (#43 e #44), tiveram grandes melhorias na distância total 20 caminhada na semana 24. Todos os pacientes, exceto o #44, que desenvolveu compressão de cordão em C1-C2, mostraram melhorias em suas distâncias caminhadas nas semanas 48 e 96. A Figura 13 mostra a melhoria de resultados do teste de caminhada de 6 minutos durante as 96 semanas de tratamento.

25 Medidas de Eficácia Adicionais

Melhorias modestas em inúmeros outros parâmetros de eficácia foram vistas durante as 96 semanas de tratamento com a droga de estudo. ROM de ombro, particularmente para flexão, melhorou em cinco dos seis pacientes de estudo na 30 avaliação da semana 24. Três dos quatro pacientes (#41, 43 e 45), com avaliações na semana 96, continuaram a mostrar aumentos de flexão de ombro. Leves melhorias também foram vistas nas medidas de função respiratória, capacidade vital

forçada (FVC) e volume expiratório forçado durante um segundo (FEV1), em três de quatro pacientes, na semana 96. A acuidade visual, medida em quatro de seis pacientes arrolados, melhorou em uma ou mais linhas em três desses 5 quatro pacientes, embora um paciente tivesse mudanças de prescrição de suas lentes durante esse período. Hepatomegalia, medida por varredura de CT, embora não seja uma característica proeminente dessa doença, também declinou modestamente, particularmente naqueles pacientes 10 com fígados maiores na linha de base.

Pouca mudança foi vista nos demais parâmetros de eficácia, incluindo função cardíaca por ECG, força de pegada e beliscão, questionário de CHAQ, altura e peso, densidade mineral óssea e estudos do sono. Nenhuma 15 deterioração significativa foi observada em qualquer desses parâmetros durante as 96 semanas.

#### Farmacocinética

Avaliações farmacocinéticas foram conduzidas durante as semanas 1, 2, 12 e 24 do estudo de duplo-cego e durante 20 as semanas 83, 84 e 96 da extensão de rótulo aberto. Começando com a semana 84, os pacientes começaram a receber rhASB fabricada pelo processo em perfusão descrito no Exemplo 9.

Amostras de sangue foram coletadas durante a infusão 25 em 0, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos, no final da infusão em 240 minutos, e após a infusão em 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 minutos. Parâmetros farmacocinéticos com relação à rhASB foram calculados usando-se métodos não 30 compartimentais. As áreas abaixo da curva de concentração plasmática X tempo no infinito em primeiro momento foram calculadas usando-se o método trapezoidal linear para o último ponto de tempo com uma concentração acima do limite qualificado de quantificação.

Aos pacientes a quem se administrou 0,2 mg/Kg/semana, os valores médios para  $AUC_{0-t}$  foram relativamente consistentes a partir da semana 1 até a semana 24 ( $10,009 \pm 5,107$  na semana 1,  $11,232 \pm 3,914$  na semana 2,  $13,812 \pm 5,230$  na semana 12 e  $13,812 \pm 9,230$  na semana 24). Para o grupo de 1,0 mg/Kg/semana, os valores médios para AUC foram de  $94,476 \pm 13,785$  na semana 1,  $180,909 \pm 46,377$  na semana 2,  $157,890 \pm 45,386$  na semana 12 e  $251,907 \pm 201,747$  na semana 24. Para esse grupo de 1,0 mg/Kg/semana, o aumento dos valores para  $AUC_{t-0}$  e  $AUC_{\infty}$  e o grande desvio padrão foi devido a um único paciente, cujas ACU's foram cerca de 2 vezes maiores do que as dos outros dois pacientes no grupo.

A comparação dos valores médios para  $AUC_{t-0}$  entre os grupos de 0,2 e 1,0 mg/Kg/semana mostrou um aumento em grande excesso do aumento de 5 vezes na dose, indicando que a farmacocinética da rhASB não é linear sobre essa faixa de dose.

Os parâmetros farmacocinéticos nas semanas 83, 84 e 96 são mostrados na Tabela 27, abaixo.

20

**Tabela 27**

| Parâmetro                         | Semana 83            | Semana 84            | Semana 96            |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| C <sub>max</sub> (ng/mL)          | $1,143 \pm 284$      | $1,367 \pm 262$      | $1,341 \pm 523$      |
| T <sub>max</sub> (min)            | 180                  | 120                  | 121                  |
| AUC <sub>t-0</sub><br>(min.ng/mL) | $172,423 \pm 49,495$ | $213,713 \pm 45,794$ | $200,116 \pm 76,506$ |
| AUC <sub>∞</sub><br>(min.ng/mL)   | $173,570 \pm 49,969$ | $215,383 \pm 47,018$ | $201,157 \pm 77,248$ |
| CL (mL/min/Kg)                    | $6,23 \pm 2,10$      | $4,81 \pm 0,99$      | $5,54 \pm 2,09$      |
| V <sub>z</sub> (mL/Kg)            | $67,6 \pm 22,0$      | $122 \pm 60,2$       | $123 \pm 17,4$       |
| V <sub>ss</sub> (mL/Kg)           | $266 \pm 52,3$       | $236 \pm 21,1$       | $233 \pm 27,6$       |
| t <sub>1/2</sub> (min), meia-vida | $8,49 \pm 4,68$      | $19,0 \pm 13,2$      | $17,3 \pm 8,26$      |
| MRT (min)                         | $44,4 \pm 7,61$      | $50,9 \pm 12,9$      | $46,1 \pm 16,1$      |

A média aritmética e o desvio padrão são relatados, exceto para T<sub>max</sub>, que é a mediana. Valores de pacientes individuais foram relatados, se n < 3.

Os parâmetros para a semana 83 eram comparáveis àqueles obtidos a partir das semanas 2 até 24 (excluindo-se

um paciente com elevadas AUC's), indicando consistência na farmacocinética de rhASB depois de exposição semanal durante aproximadamente 18 meses. A partir da semana 83 a semana 84, os valores médios de AUC tenderam para cima em 5 aproximadamente 25%, enquanto que a eliminação corporal total tendeu para baixo em aproximadamente 25%. A partir da semana 83 a semana 84, a meia-vida diminuiu desde cerca de 8,5 minutos a 17 - 19 minutos. Os parâmetros a partir da semana 96 eram comparáveis àqueles a partir da semana 84.

10 Embora esses dados farmacocinéticos sejam provenientes de um pequeno número de pacientes e de que houve substancial sobreposição de valores individuais, esses resultados indicaram que a preparação de rhASB de elevada pureza, obtida a partir do processo modificado descrito no Exemplo 15 9, teve uma meia-vida mais longa do que a preparação de rhASB original.

#### **EXEMPLO 12**

##### **Estudo Clínico em Humanos**

Um teste clínico de rótulo aberto de fase 2 de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana recombinante (rhASB) 20 em pacientes com mucopolissacaridose VI (MPS VI), Síndrome de Maroteaux-Lamy, foi conduzido usando-se o produto de droga produzido de acordo com o novo processo em perfusão descrito no Exemplo 9. A rhASB foi formulada em uma 25 concentração de 1 mg/mL, pH 5,8, fosfato de sódio monobásico.1 H<sub>2</sub>O, 9 mM, fosfato de sódio dibásico.7 H<sub>2</sub>O, 1 mM, cloreto de sódio 150 mM, Polissorbato 80 à 0,005%.

O objetivo desse estudo foi avaliar a segurança, a eficácia e a farmacocinética de 1,0 mg/Kg de rhASB, dado 30 como uma infusão i.v. semanalmente. Os critérios de inclusão foram modificados para esse estudo para incluir um conjunto relativamente uniforme de pacientes com resistência física prejudicada. Os pacientes tiveram que

ser capazes de caminhar pelo menos 1 m, mas, não mais do que 250 m, nos primeiros 6 minutos de um teste de caminhada de 12 minutos, na linha de base. Os outros critérios de inclusão e de exclusão foram similares àqueles do Estudo de 5 Fases 1 e 2, no qual os pacientes tiveram que ter pelo menos cinco anos de idade e ter um diagnóstico bioquímico ou genético documentado. Além do teste de caminhada, inúmeros casos terminais, não previamente estudados em pacientes com MPS, foram incluídos nesse estudo.

10 Medidas de segurança incluíram avaliações de laboratório clínicas, urinálise, CBC com diferencial, ECG e rastreamento de AE's. Reações associadas com a infusão, assim como consumo complementar e formação de anticorpos estão sendo avaliadas para todos os pacientes. Os 15 parâmetros de eficácia incluíram medidas de resistência física e de mobilidade, incluindo um teste de caminhada de 12 minutos, o teste de Levante e Vá Temporizado Expandido, o teste de subida de escadas de 3 minutos e atividade física. Efeitos subjetivos, tais como dor em junta e 20 rigidez em junta, foram avaliados com um questionário, e outras medidas na escala Desenvolvimental de Denver, tais como o tempo para se amarrar os sapatos, para se tocar o topo da cabeça, para se colocar um suéter e para se pegar moedas e coloca-las em um copo também foram avaliados. 25 Medidas adicionais de eficácia incluíram medições de acuidade visual, estudos de densidade óssea, avaliação de pegada e beliscão, ROM de ombro, estado funcional, função pulmonar, excreção de GAG's urinários, exames visuais, função cardíaca e saturação de oxigênio durante o sono. 30 Avaliações de farmacocinética foram conduzidas durante infusões nas semanas 1, 2, 12 e 24, para medir os níveis de antígeno (enzima) durante e depois da infusão. Dez pacientes foram arrolados - cinco nos Estados Unidos e

cinco na Austrália. Todos os pacientes completaram a semana 24 de tratamento. Não houve mortes ou interrupções. Todos os pacientes receberam todas as 24 infusões da droga de estudo; portanto, todos os pacientes foram incluídos nas 5 análises de segurança e de eficácia.

Como no estudo de Fases 1 e 2, houve ampla heterogeneidade de severidade da doença entre os pacientes de MPS VI arrolados no Estudo de Fase 2. Vários pacientes também tiveram características neurológicas da doença, 10 incluindo comunicação de hidrocefalia, instabilidade da espinha cervical e doença de disco espinhal.

#### Avaliações de Laboratório Clínicas

Nenhuma anormalidade de laboratório clinicamente significativa foi observada nesses pacientes durante o 15 período de 24 meses.

#### Estudos de Complemento e de Anticorpos anti-rhASB

Oito dos 10 pacientes desenvolveram anticorpos com relação à rhASB na semana 24. Dos três pacientes que desenvolveram níveis mais elevados de anticorpos do que os 20 outros pacientes, os níveis de anticorpos de dois pacientes continuaram a se elevar depois de 24 semanas, mas, pareceram ter se estabilizado na semana 48. Desses, dois pacientes eram o genótipo "nulo" ou tinham uma mutação no sítio antigênico principal assumido para ASB. A redução em 25 GAG's urinários foi menor para esses dois pacientes, em comparação aos outros. A Figura 14 mostra níveis de anticorpos durante 48 semanas de tratamento.

Na semana 24, um paciente diminuiu os valores de C4 e CH50, tanto antes quanto após a semana 12 de infusão, que 30 foram considerados como sendo clinicamente significativos pelo investigador. C4 e CH50 estavam ligeiramente abaixo do limite inferior do normal antes da infusão, e mostraram uma maior diminuição seguindo a infusão. Embora esses

resultados sugerissem a possibilidade de consumo complementar, nenhum sinal clínico ou sintoma consistente com tal consumo foi observado. Não foram observadas anormalidades clinicamente significativas em níveis de 5 complemento em qualquer dos outros pacientes no estudo.

#### Glicosaminoglicanos Urinários

A redução média nos níveis de GAG's urinários foi rápida, alcançando um nadir na semana 6, e permanecendo relativamente constantes da semana 6 até a semana 24. Na 10 semana 24, os GAG's urinários foram reduzidos em uma média de 71%, e, na semana 48, os GAG's urinários foram reduzidos em uma média de 76%. Todos os dez pacientes mostraram uma diminuição nos níveis de GAG's urinários que se aproximaram da faixa normal, depois de 24 semanas de tratamento. Esses 15 dados são consistentes com os resultados vistos para os sete pacientes no estudo das Fases 1 e 2. A Figura 15 mostra a redução nos níveis de GAG's urinários totais durante as 48 semanas, e a Figura 16 mostra uma comparação dos níveis na semana 48 com relação aos níveis normais 20 apropriados à idade.

#### Medidas de Resistência Física

A distância caminhada foi avaliada em um teste de caminhada de 12 minutos para todos os pacientes na linha de base e a cada seis semanas depois disso. A distância foi 25 registrada como a média de duas medidas separadas em cada avaliação e foi determinada tanto aos 6 minutos quanto aos 12 minutos.

Na linha de base, as distâncias médias caminhadas em 6 e 12 minutos foram de 152,4 ( $\pm$  75,0) e 264,0 ( $\pm$  161,7) 30 metros, respectivamente. Na semana 24, a distância média caminhada em 6 minutos tinha melhorado em 57,3 ( $\pm$  59,0) metros (62% por paciente), enquanto que a distância média caminhada em 12 minutos tinha melhorado em uma média de 155

metros (98% por paciente). Todos os pacientes melhoraram a sua distância caminhada em 12 minutos, e todos, exceto um, pacientes melhoraram nos primeiros 6 minutos da caminhada.

Na semana 48, a melhoria média no teste de caminhada de 12 5 minutos foi de 212 metros (138% por paciente). A Figura 17 mostra a melhora nos resultados de teste de caminhada de 12 minutos, durante as 48 semanas.

O teste de subida de escada de 3 minutos foi a segunda medição de resistência física testada. Na linha de base, os 10 pacientes podiam subir uma média de 50,3 ( $\pm$  29,5) degraus.

Em 24 semanas, o número médio de degraus subidos tinha aumentado para 98,1 ( $\pm$  62,5) degraus, uma melhoria de 48 degraus ou de 110% por paciente ( $\pm$  116%). Em 48 semanas, o 15 número médio de degraus subidos tinha aumentado em 61 degraus para um total de 111 degraus, uma melhoria de 147% por paciente. A Figura 18 mostra a melhoria nos resultados de subida de escadas de 3 minutos, durante as 48 semanas. Os pacientes variaram grandemente em termos do número de degraus subidos, e o desempenho na linha de base não 20 necessariamente se correlaciona com o grau de melhoria na semana 24.

#### Medições de Eficácia Adicionais

Inúmeros parâmetros de eficácia adicionais foram avaliados durante as primeiras 24 semanas desse estudo. O 25 Teste de Levantar e Ir Temporizado Estendido foi usado como uma medida da capacidade funcional geral. Globalmente, não houve redução significativa no tempo total necessário para esse teste entre a linha de base na semana 24, mas, houve uma modesta melhoria na semana 48. A Figura 19 mostra 30 resultados do Teste de Levantar e Ir Temporizado Estendido durante as 48 semanas de tratamento.

O Tempo de Expiração Forçada (FET), FVC e FEV1 foram realizados para avaliar a função pulmonar. A Tabela 28

abaixo exibe os valores de função pulmonar na línhia de base, na semana 24 e na semana 48 e também mostra melhoria de altura e de organomegalia na semana 48. Nenhuma mudança significativa nesses parâmetros foi vista durante o periodo 5 de 24 semanas. Na semana 48, 5/10 pacientes melhoraram em FVC e FEV<sub>1</sub>, dos quais 3 dos 5 mostraram melhoria apesar de que menos de 2% mudaram de tamanho. Na semana 48, também houve uma melhora média de 43% no Tempo de Expiração Forçada (> 1 segundo).

**Tabela 28**  
**Função Pulmonar versus Crescimento & Organomegalia**

| Paciente | Idade | Linha de base da altura (cm) | Linha de base da FVC (litros) | FVC semana 24 | FVC semana 48 | Mudança de altura [cm] (%) | %Δ Fígado Semana 48 | %Δ Fígado Semana 48* | %Δ Baco Semana 48 | %Δ Baco Semana 48* |
|----------|-------|------------------------------|-------------------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| 200      | 18    | 96,2                         | 0,47                          | 0,44          | 0,48          | -0,05 (<1)                 | -6,3                | -15,2*               | -5,88             | -13,90             |
| 201      | 9     | 93,2                         | 0,52                          | 0,54          | 0,60          | 6,65 (7,1)                 | -2,3                | -14,4*               | -8,82             | -20,17             |
| 202      | 17    | 120                          | 0,75                          | ND            | 0,92          | 0,95 (<1)                  | -6,7                | -5,3                 | -27,81            | -26,69             |
| 203      | 15    | 107                          | 0,28                          | 0,27          | 0,38          | 1,9 (1,8)                  | -8,6                | -12,5                | -16,45            | -20,22             |
| 204      | 7     | 87                           | 0,52                          | 0,60          | 0,56          | 3,6 (4,4)                  | -1,3                | -4,5                 | -6,74             | -9,71              |
| 300      | 22    | 102,4                        | 0,37                          | 0,39          | 0,37          | 2,5 (2,4)                  | -15,5               | -20*                 | -16,58            | -21,09             |
| 301      | 9     | 121,1                        | 1,40                          | 1,46          | 1,55          | 4,9 (4,0)                  | +26,3               | +3                   | -19,67            | -2,56              |
| 302      | 6     | 99,7                         | 0,81                          | 0,85          | 0,83          | 4,8 (4,8)                  | +5,7                | -13                  | -1,92             | -19,99             |
| 303      | 6     | 84,6                         | 0,16                          | 0,27          | 0,31          | 1,1 (1,3)                  | -5,8                | -1,3*                | -45,33            | -49,38             |
| 304      | 16    | 124,7                        | 0,93                          | 0,74          | 0,83          | 1,3 (1,0)                  | -2,8                | -15*                 | 6,93              | -6,03              |

<sup>1</sup>Os valores em negrito indicam valores de FVC que representam aumentos clinicamente significativos

<sup>2</sup>Tamanho médio do fígado na linha de base 681,6 ± 118 cm<sup>3</sup>

<sup>3</sup>Tamanho médio do baco na linha de base 146,8 ± 40 cm<sup>3</sup>

\*Volumes de fígado acima de 95% da idade ajustado à idade para o peso corporal na linha de base e na semana 48

†Volumes de fígado acima de 95% do limite ajustado à idade para o peso corporal na linha de base e na semana 48

**Tabela 29**  
**Amplitude de Movimento de Ombro**

| Movimento do Ombro                    | Linha de Base | Mudança (e semana 24<br>(graus de função) | Mudança (e semana 48 |
|---------------------------------------|---------------|---|----------------------|
| Todos os pacientes (n = 10)           |               |   |                      |
| Flexão ativa                          | 102           | 6   | 3                    |
| Flexão passiva                        | 116           | 4   | (1)                  |
| Extensão ativa                        | 52            | 5   | 5                    |
| Extensão passiva                      | 63            | 9   | (6)                  |
| Rotação lateral ativa                 | 59            | 7   | 6                    |
| Rotação lateral passiva               | 65            | 9   | (6)                  |
| Pacientes com flexão do linha de base |               |   |                      |
| < 90° (n = 3)                         |               |   |                      |
| Flexão ativa                          | 85            | 9   | 5                    |
| Extensão ativa                        | 50            | 6   | 4                    |
| Rotação lateral ativa                 | 52            | 7   | 7                    |

ROM de ombro (flexão, extensão, rotação) foi avaliada tanto ativamente quanto passivamente. Globalmente para o grupo, viu-se um modesto aumento percentual em ROM tanto ativo quanto passivo; no entanto, alguns pacientes 5 mostraram uma diminuição em algumas medições em 24 semanas. Em 48 semanas, houve uma grande variabilidade nos resultados devido à vários agentes externos; contudo, continuou a ser vista melhoria em ROM de ombro, particularmente em pacientes que tinham menos do que 90 10 graus de flexão na linha de base. A Tabela 29 acima exibe os graus de amplitude de movimento de ombro na linha de base, na semana 24 a na semana 48.

Dor e rigidez foram avaliadas usando-se um questionário. Enquanto que dois pacientes não tiveram 15 mudança na classificação de dor, sete pacientes mostraram melhoria na dor na semana 24 (um paciente não teve avaliação de linha de base). Todos os nove pacientes avaliados mostraram melhoria na rigidez na semana 24. Dor e rigidez, avaliadas usando-se o questionário, continuaram a 20 melhorar até a semana 48. Os resultados do questionário de dor de junta e do questionário de rigidez durante as 48 semanas de tratamento são mostrados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Melhorias significativas na força de pegada foram 25 vistas através de todo o grupo de pacientes. Sete pacientes tiveram melhorias na força de pegada para uma ou ambas as mãos. Pouca mudança foi vista no teste de beliscão durante o período de 24 semanas. Houve pouca mudança significativa nas outras avaliações de qualidade de vida, exceto aquela 30 na semana 48, houve uma modesta melhora em Destreza e Sensação (conforme medidas pelo teste de catação de moedas).

Níveis de atividade foram medidos usando-se o dispositivo ligado por cinto ActiTrac®. Nenhuma mudança significativa no nível de atividade foi observada.

Não se observou qualquer mudança significativa nas 5 avaliações de função cardíaca (ECG's) ou em altura de pé ou em comprimento de supino. Estudos de sono, realizados em um subconjunto de pacientes, não mostrou mudanças clinicamente significativas.

Embora a invenção tenha sido descrita com 10 referência às concretizações presentemente preferidas, deve ser entendido que várias modificações podem ser feitas sem se desviar do espírito da invenção. Conseqüentemente, a invenção é limitada somente pelas reivindicações apensas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana, **caracterizada** pelo fato de que a composição compreende:

- 5                   i) precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana produzida por um processo de perfusão e que tem uma pureza pelo menos igual ou maior do que 99%, com base na proteína total, em que a pureza é medida usando-se o método de HPLC de fase reversa (RP-HPLC), e em  
10 que a composição é livre de bandas detectáveis de cerca de 47-48 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com coloração de Coomassie e;  
                  ii) solução de cloreto de sódio e um detergente não iônico.

15                2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana é uma precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana recombinante.

20                3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a dita precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana tem uma pureza pelo menos igual ou maior do que 99,2%, com base na proteína total, em que a pureza é medida usando-se o método de HPLC de fase reversa (RP-HPLC), ou em que a pureza é igual ou  
25 maior do que 99,5%, ou em que a pureza é igual ou maior do que 99,9%.

30                4. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana estar glicosilada.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, **caracterizada** pelo fato de que a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana tem uma pureza pelo menos igual ou maior do que 99%, com

base na proteína total, em que a pureza é medida usando-se o método de HPLC de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC), ou em que a pureza por SEC-HPLC é igual ou maior do que 99,5%, ou em que a pureza por RP-HPLC é igual ou maior do que 99% e a pureza por SEC-HPLC é igual ou maior do que 99,5%.

6. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de compreender uma composição conforme a reivindicação 1 ou 2 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

10 7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a precursora de N-acetilgalactosamina-4-sulfatase humana está presente em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 5 mg/mL ou cerca de 50 a cerca de 250 Unidades por mL.

15 8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de compreender um tampão de fosfato de sódio em uma concentração de cerca de 10 a cerca de 50 mM.

20 9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o pH da solução está mantido em cerca de 5,8.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de compreender um polioxietileno-sorbitano.

25 11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que o polioxietileno-sorbitano é polioxietileno-sorbitano 20 ou 80 e a concentração do polioxietileno-sorbitano 20 ou 80 é de cerca de 0,005% (peso/volume).

30 12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, **caracterizada** pelo fato de ser para uso no tratamento de uma doença causada, no todo ou em parte, por uma

deficiência em N-acetilgalatosamina-4-sulfatase, em que a doença é mucopolissacaridose, MPS VI ou Síndrome de Maroteaux-Lamy.

13. Composição para uso, de acordo com a  
5 reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que o paciente tem cerca de 10% ou menos de uma atividade normal de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase.

14. Uso de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,  
10 10 ou 11, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratamento de uma doença causada, no todo ou em parte, por uma deficiência em N-acetilgalatosamina-4-sulfatase, em que a doença é mucopolissacaridose, MPS VI ou Síndrome de Maroteaux-Lamy.

15 15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, ou a composição farmacêutica para uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o medicamento é para tratamento de um humano.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 14, ou a  
20 composição farmacêutica para uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade de precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana é eficaz para fornecer um ou mais efeitos benéficos selecionados a partir do grupo consistindo em  
25 mobilidade de junta, dor de junta, rigidez de junta, tolerância ao exercício, resistência física ao exercício, função pulmonar, acuidade visual e atividades da vida diária.

17. Composição farmacêutica **caracterizada** por  
30 compreender precursora de N-acetilgalatosamina-4-sulfatase humana conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e um polioxietileno-sorbitano, em uma concentração

variando desde cerca de 0,002% a cerca de 0,008% (peso/volume).

18. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada** pelo fato de que o 5 polioxietileno-sorbitano é o polioxietileno-sorbitano 80 em uma concentração de 0,005% (peso/volume).

FIG. 1

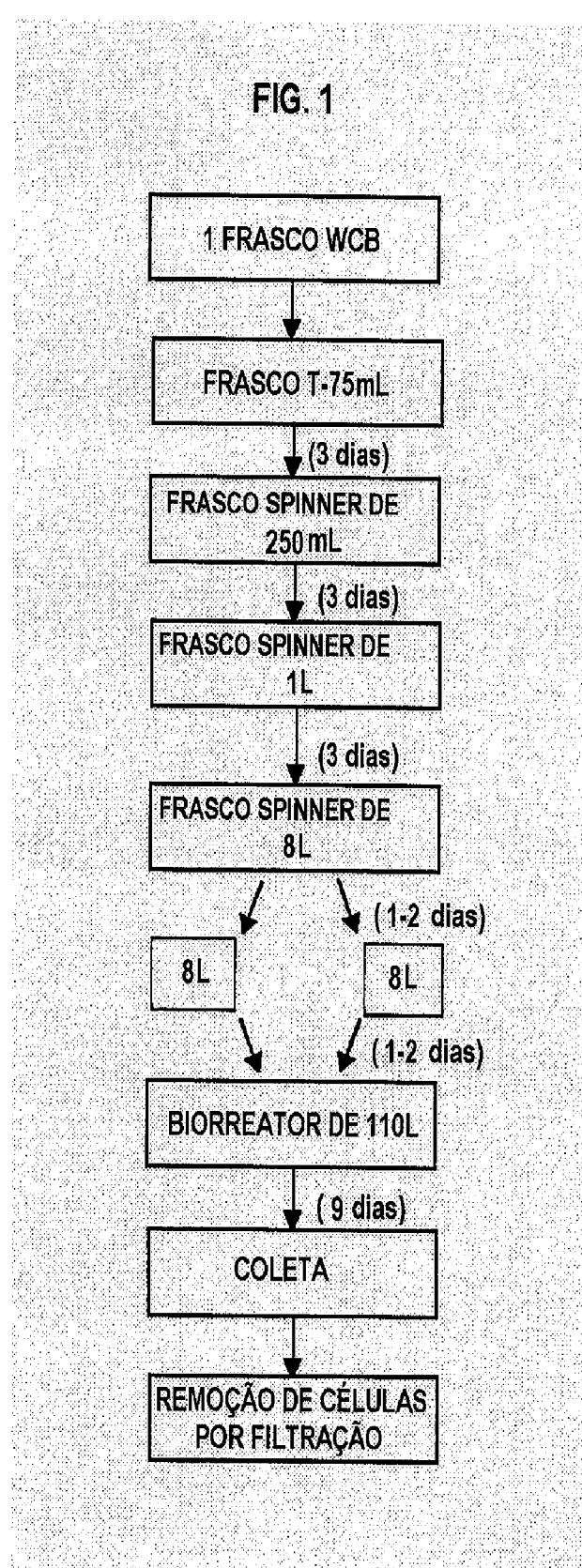
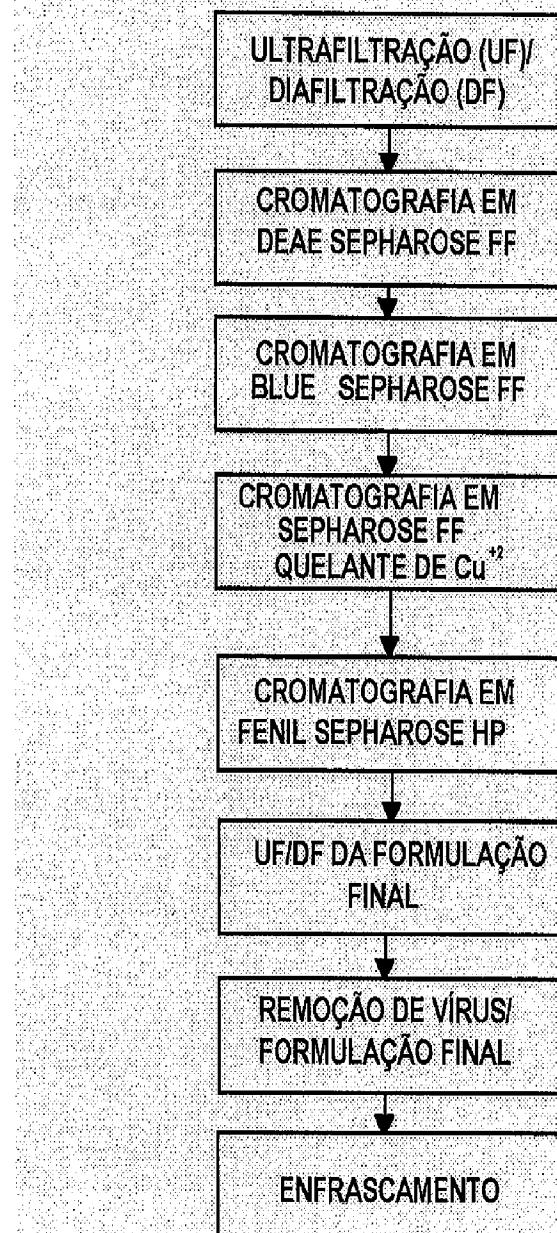


FIG. 2

FLUXOGRAMA DO PROCESSO  
DE PURIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA  
DE DROGA DE rh ASB



**FIG. 3**  
FLUXOGRAMA DE PROCESSO - PLANO DE AMOSTRAGEM

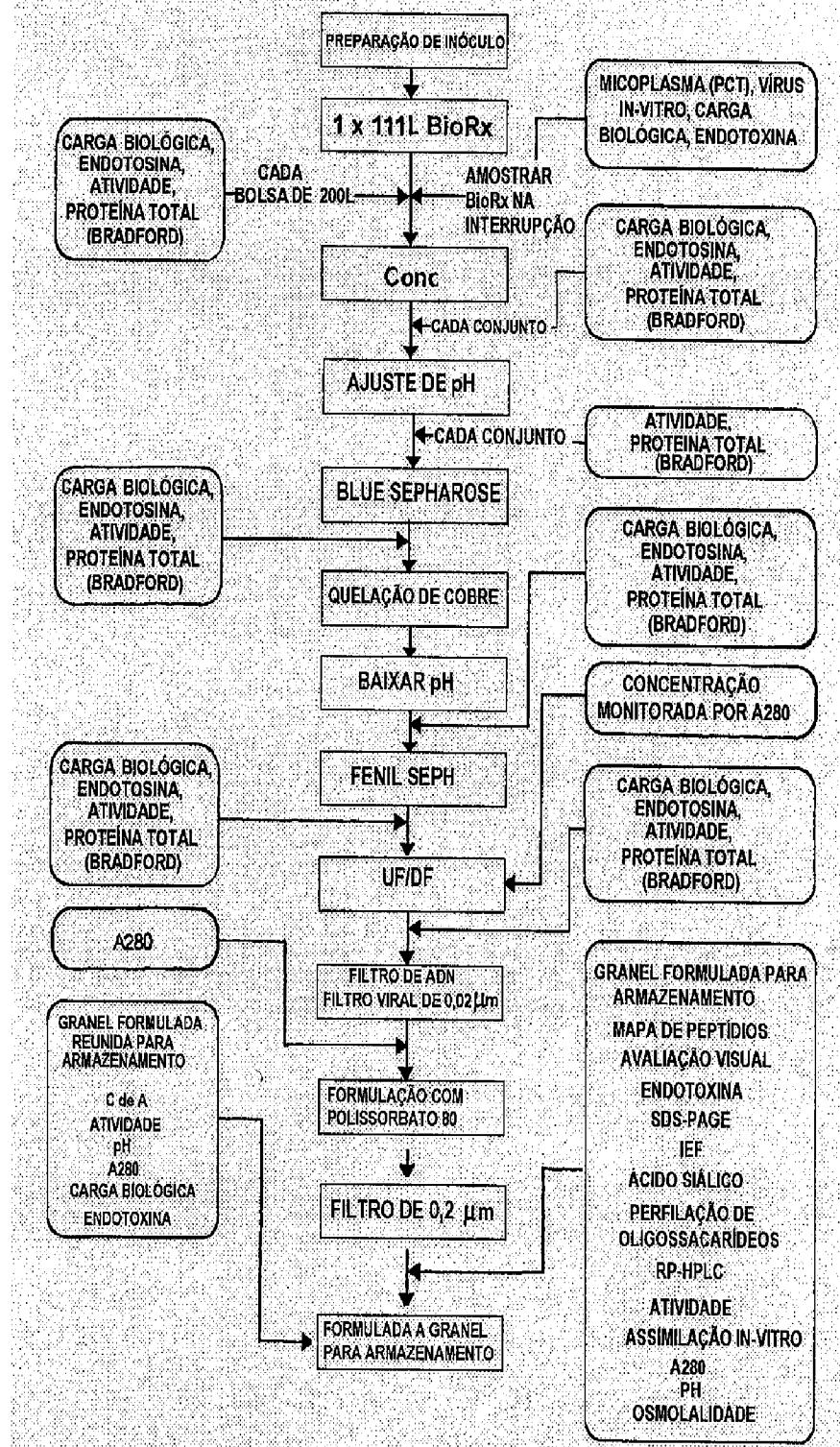


FIG. 4A

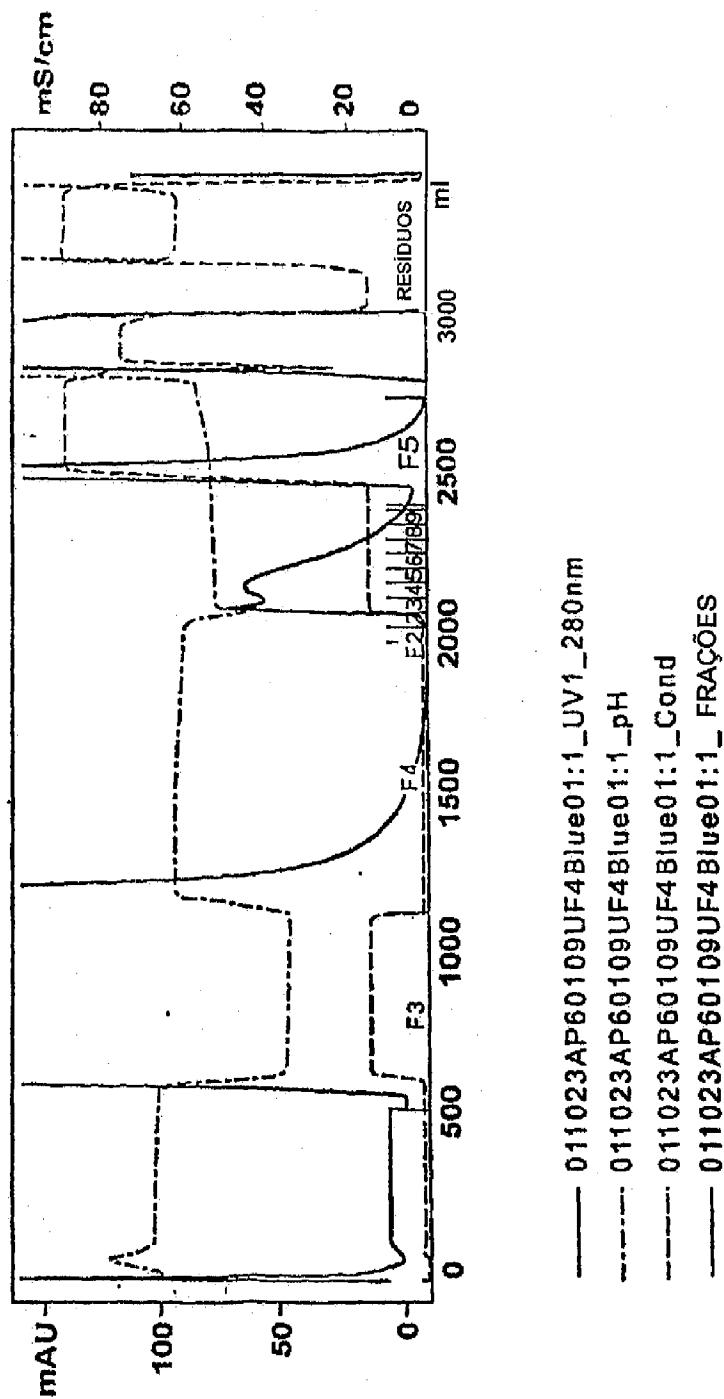


FIG. 4B

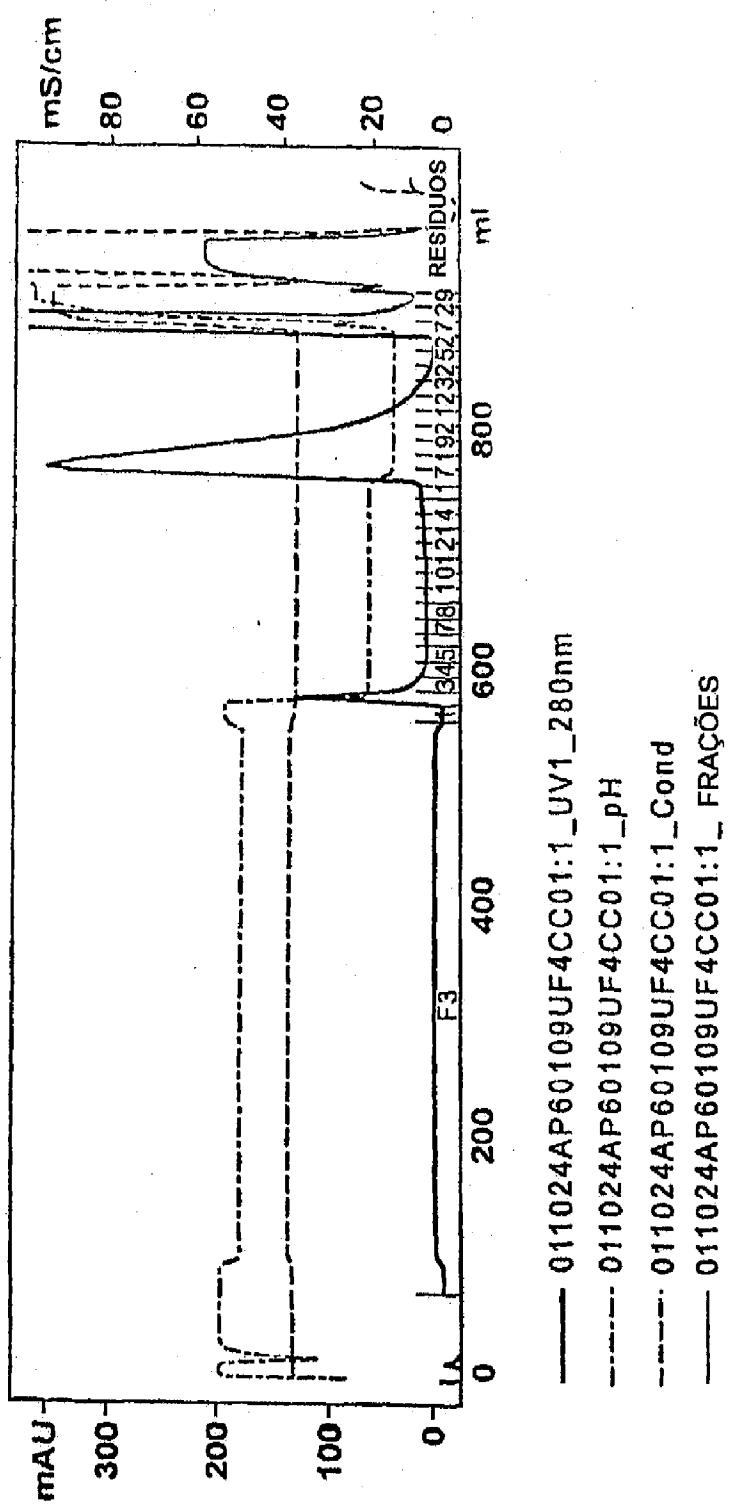


FIG. 4C

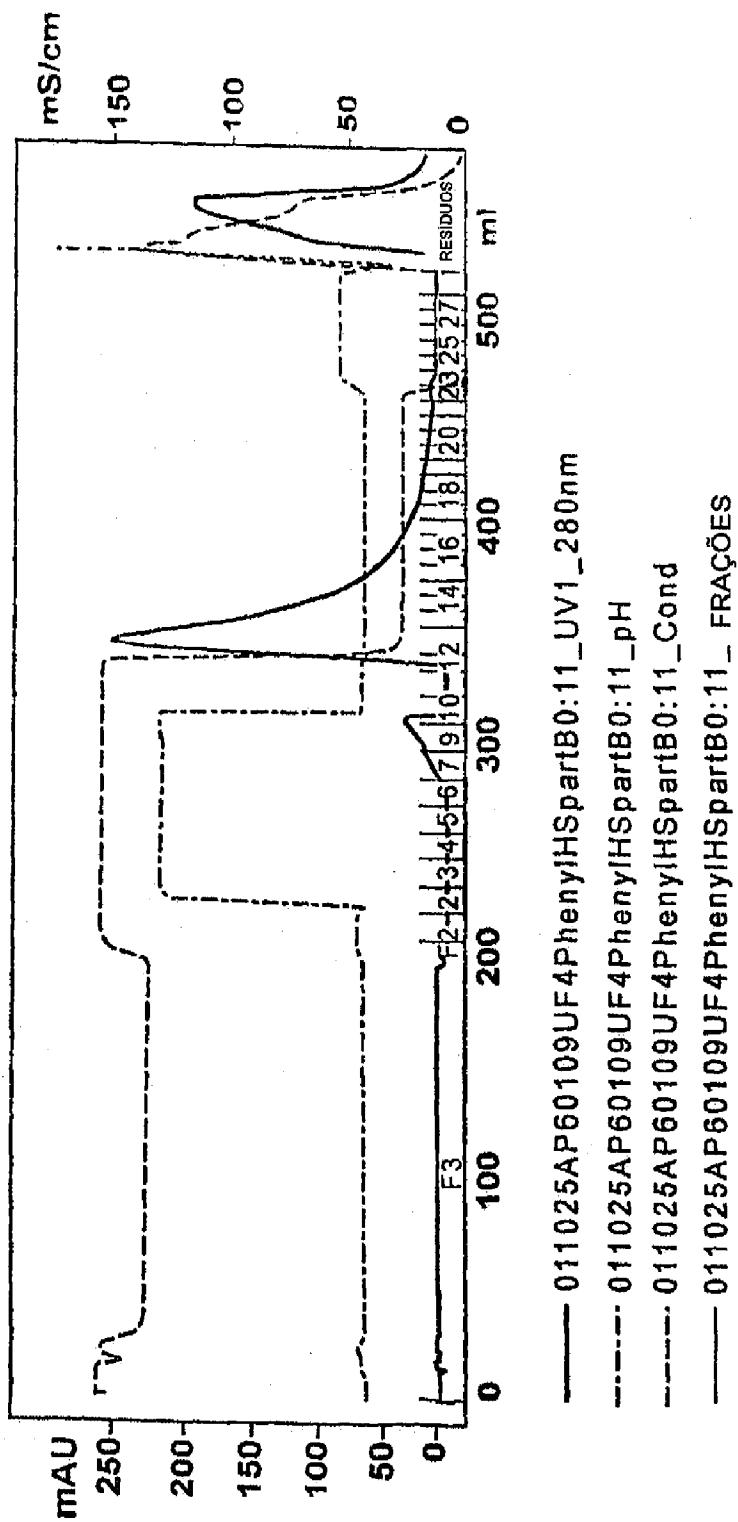
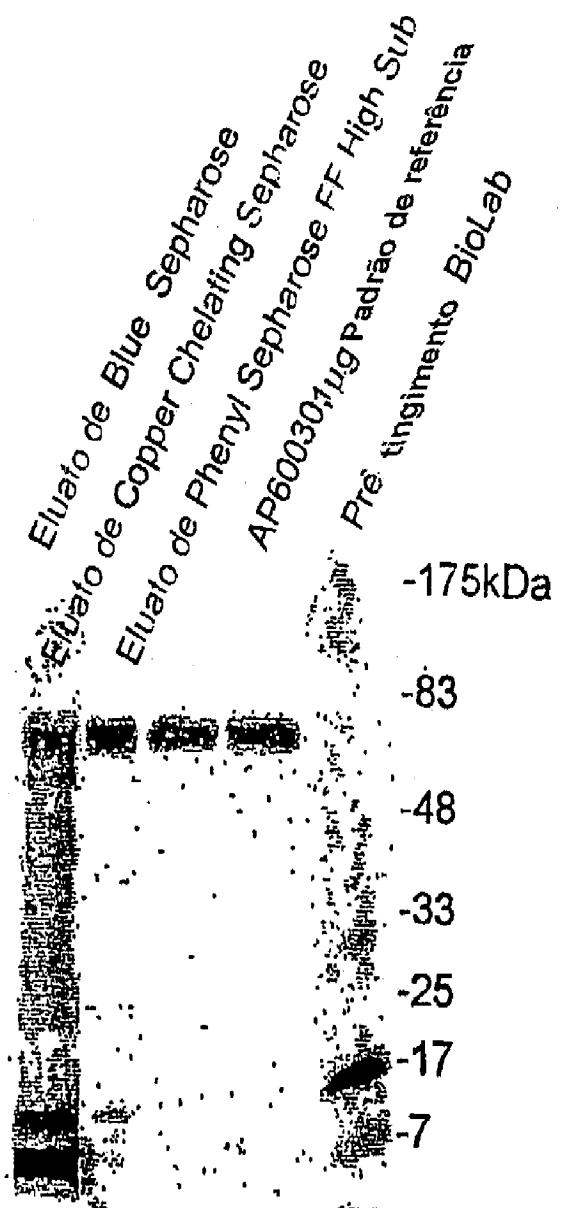
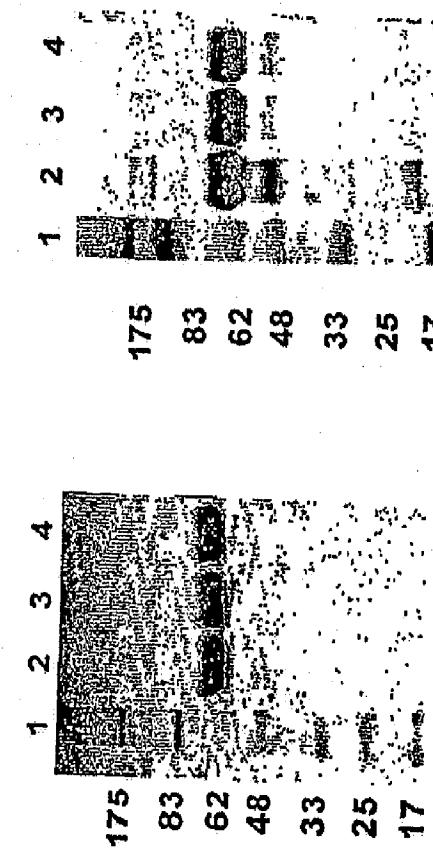
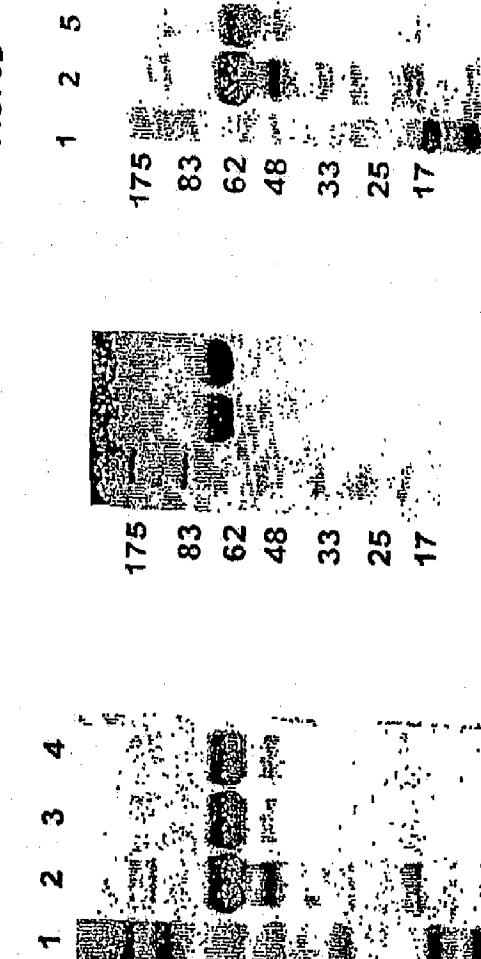
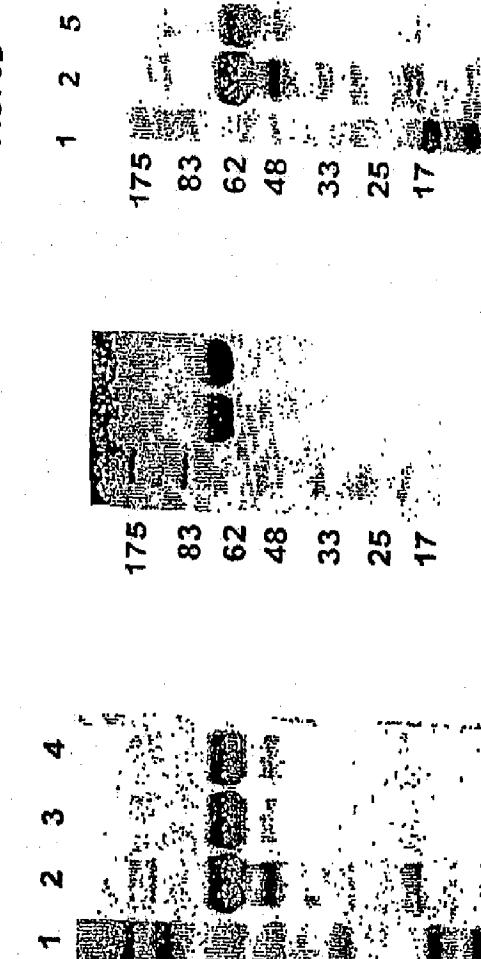


FIG. 5



**GEL DE SDS-PAGE, 4-20% TG  
TINGIMENTO COM PRATA**

**FIG. 6A****FIG. 6B****FIG. 6C****FIG. 6D**

GEIS DE SDS COM GRADIENTE DE POLIACRILAMIDA DE 4-20%, TINGIDOS COM COOMASSIE R-250 OU PRATA

1 PADRÕES PRÉ-TINGIDOS DE AMPLA FAIXA

- 2 5  $\mu$ g ASB AS60001 (PROCESSO EM BATELADA)
- 3 5  $\mu$ g Ap60109UF4
- 4 5  $\mu$ g Ap60109UF10
- 5 5  $\mu$ g Ap60109UF15

FIG. 6E

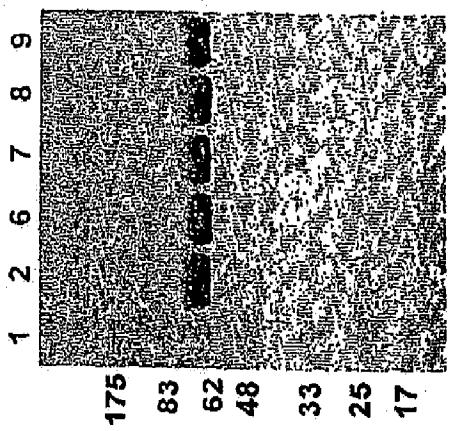
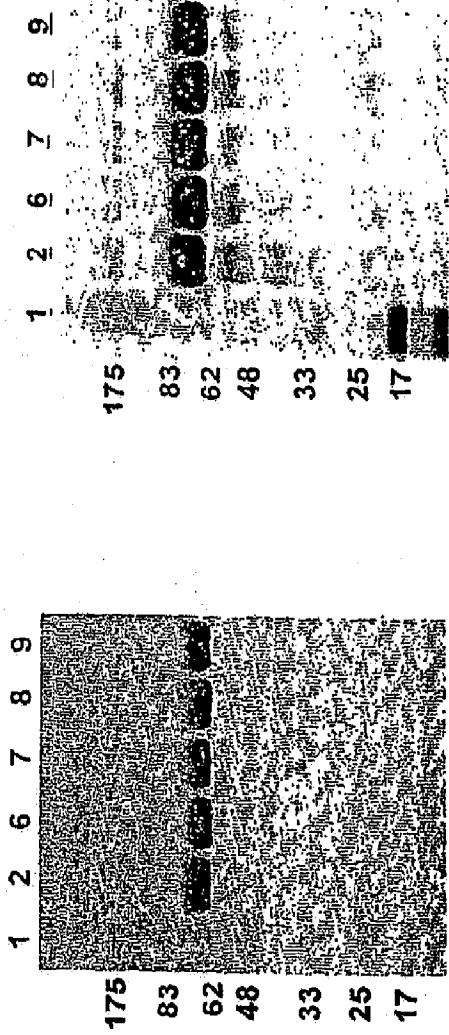


FIG. 6F



GÉIS DE SDS COM GRADIENTE DE POLIACRILAMIDA DE 4-20%, TINGIDOS COM COOMASSIE R-250 OU PRATA

- 1 PADRÕES PRÉ-TINGIDOS DE AMPLA FAIXA
- 2 5 µg ASB AS60001 (PROCESSO EM BATELADA)
- 3 5 µg Ap60109UF4
- 4 5 µg Ap60109UF10
- 5 5 µg Ap60109UF15
- 6 5 µg Ap60109UF18
- 7 5 µg Ap60109UF22
- 8 5 µg Ap60109UF25
- 9 5 µg Ap60109UF27

FIG. 7A

rhASb FORMULADA , 052202  
5 µg/ TRILHA

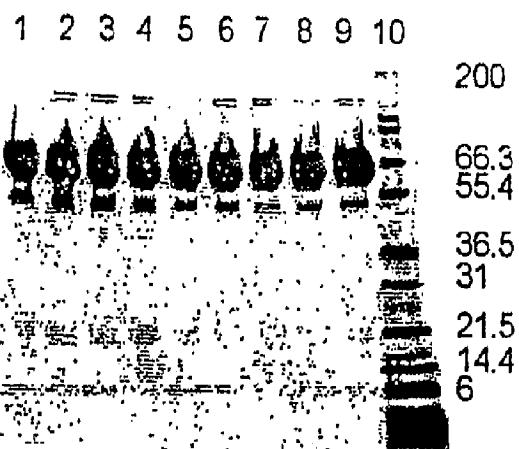
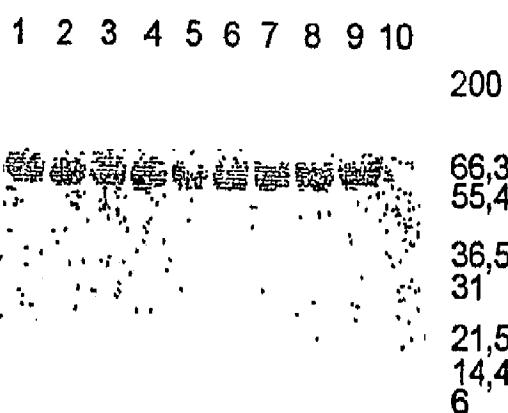


FIG. 7B



- |                  |                    |
|------------------|--------------------|
| 1. AP60202 UF 4  | 6. 102PD0139xB5    |
| 2. AP60202 UF 10 | 7. rhASB-202-002   |
| 3. AP60202 UF 18 | 8. 102PD0136 P1    |
| 4. AP60202 (BMK) | 9. 102PD0136 P2    |
| 5. 102PD0139xB3  | 10. PADRÃO MARK 12 |

FIG. 8A

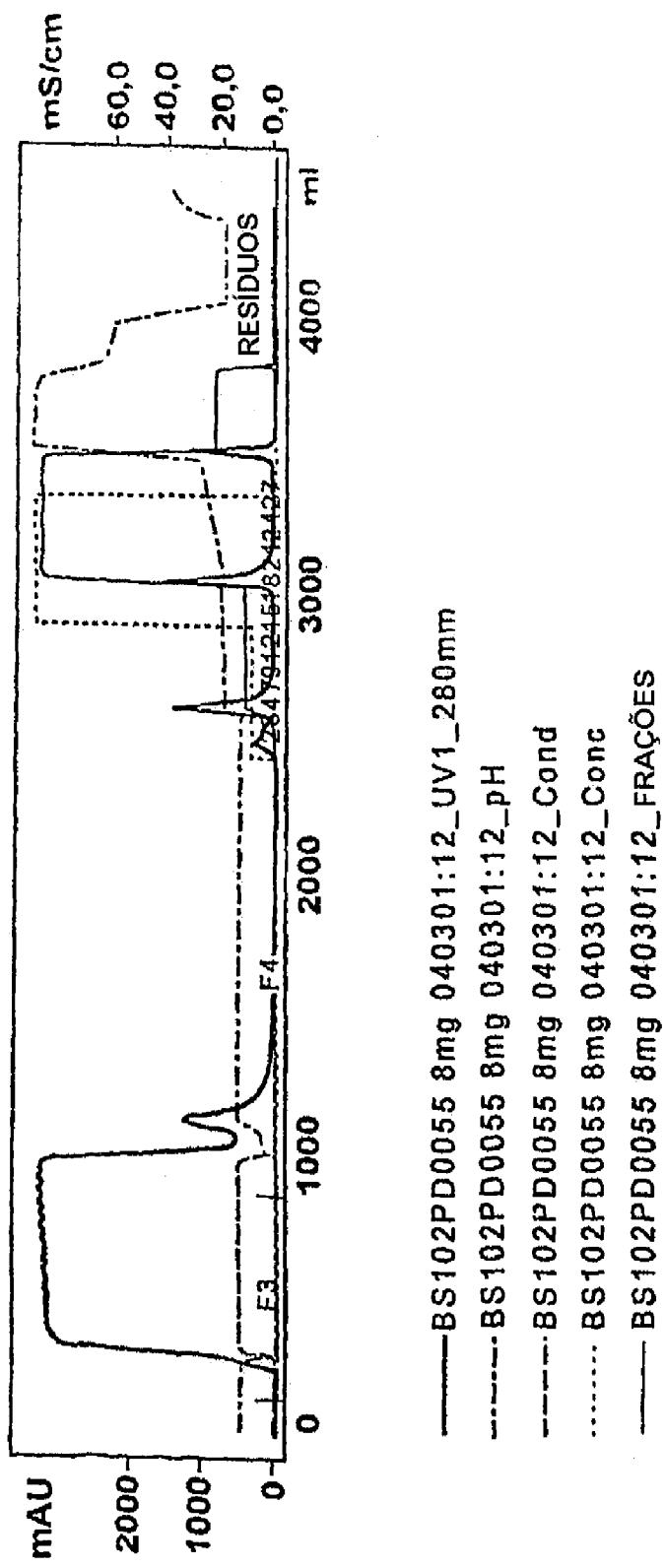


FIG. 8B

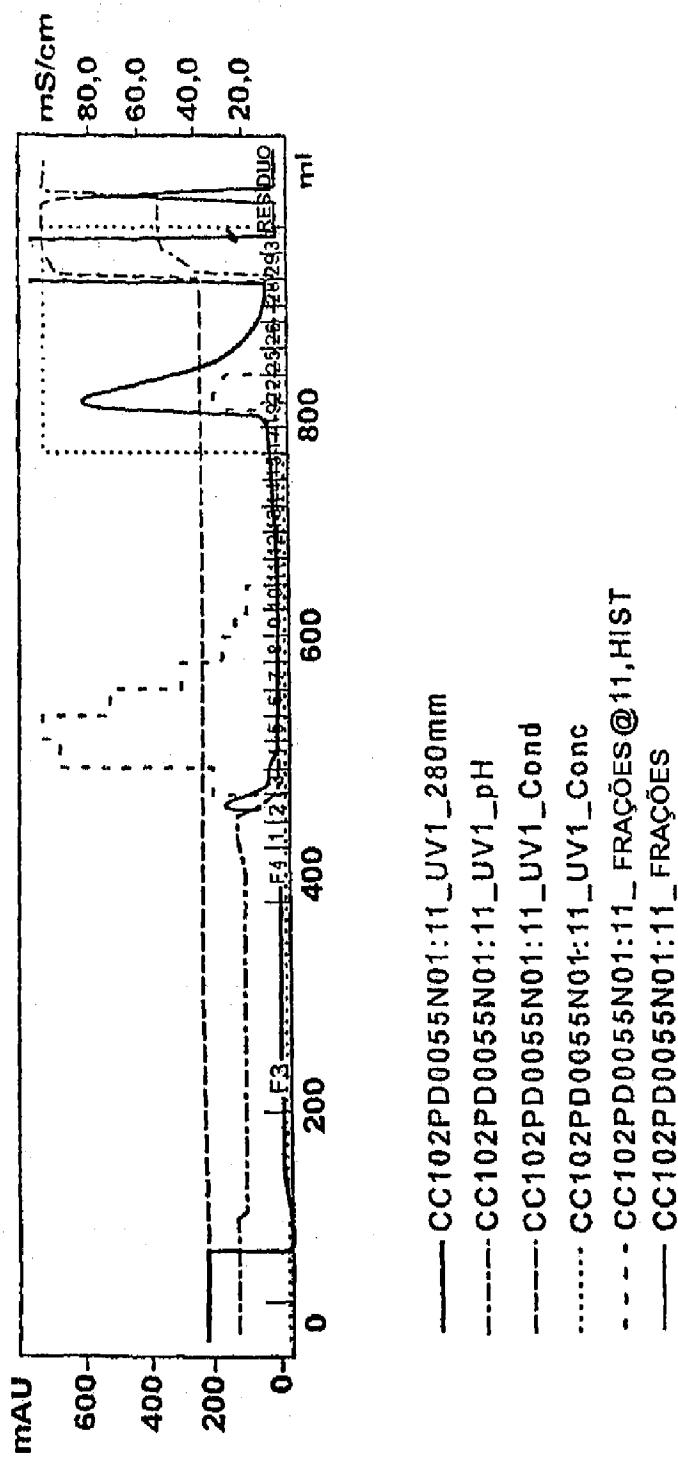
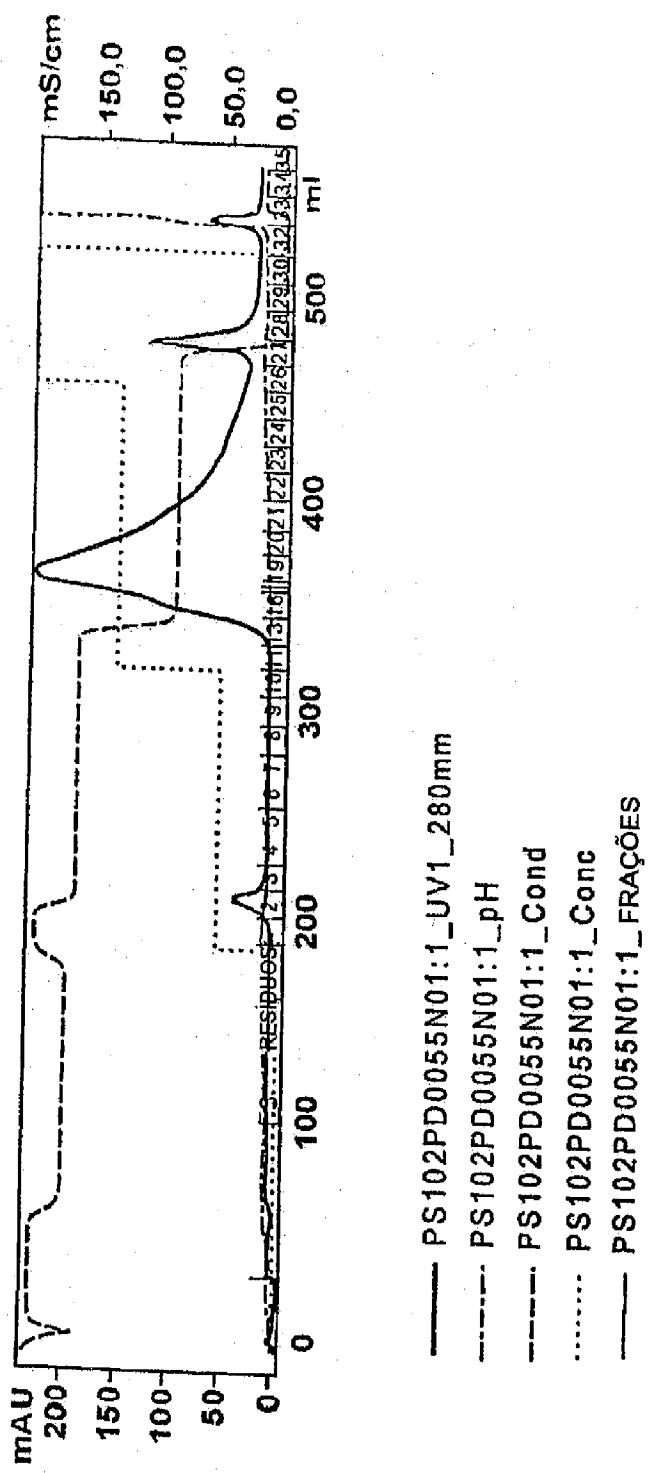


FIG. 8C



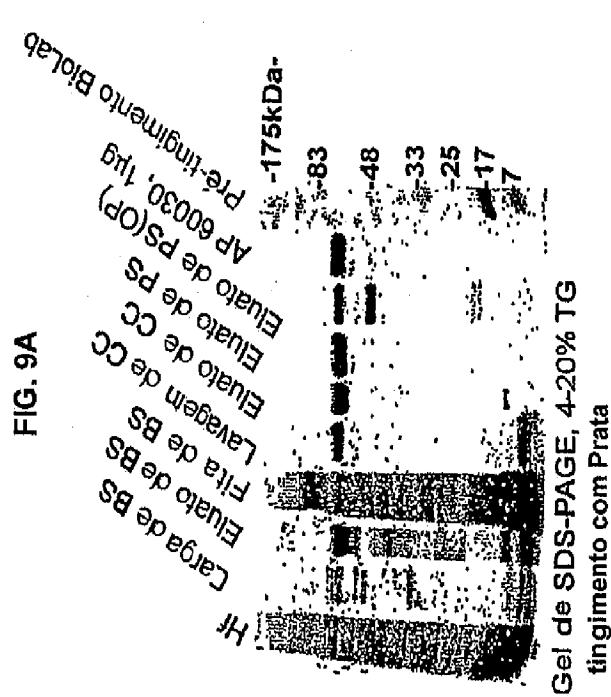


FIG. 9A

FIG. 9B

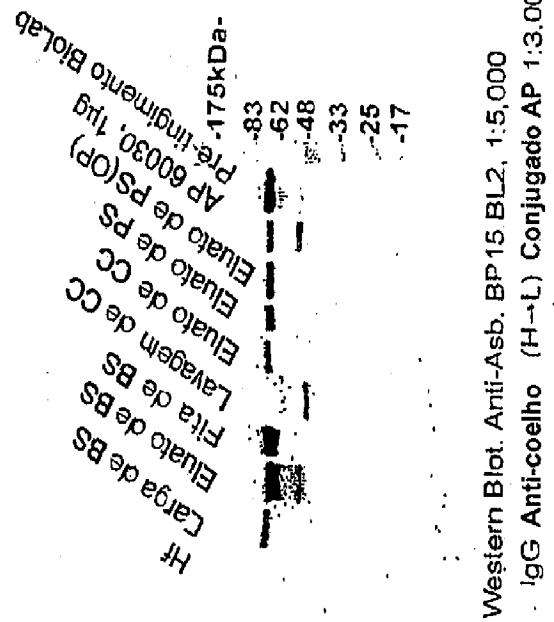
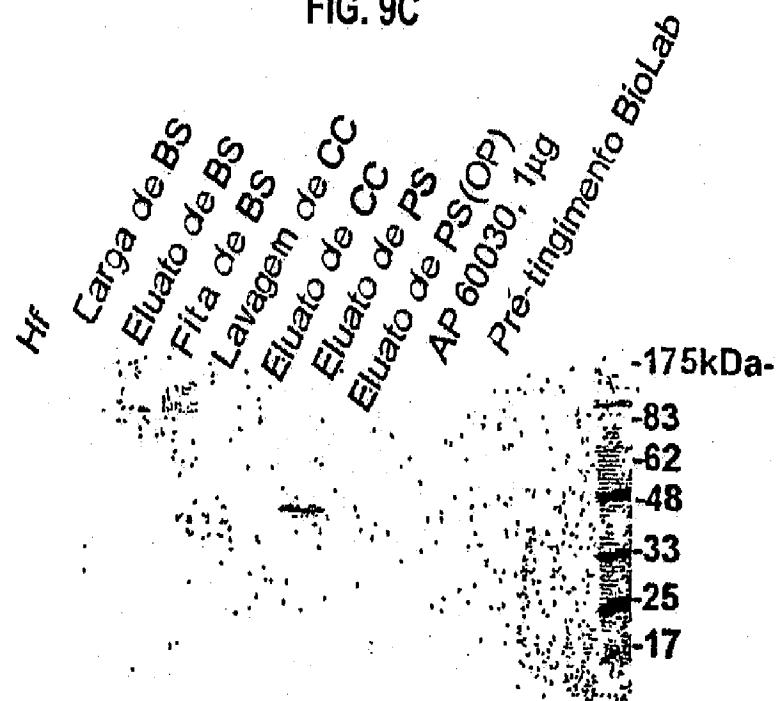


FIG. 9C



Western Blot, IgG G-Anti-Catepsina, M19, 1:5,000  
IgG de mula-anti\_cabra AP1:5,000

FIG. 10

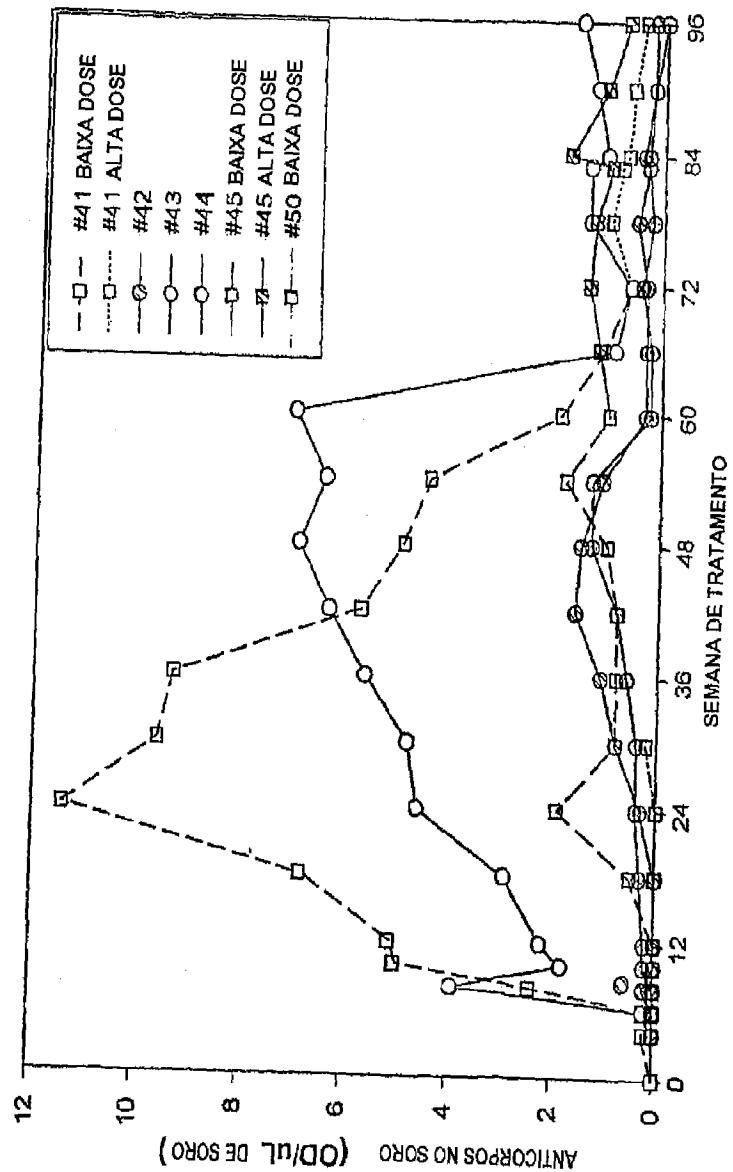


FIG. 11

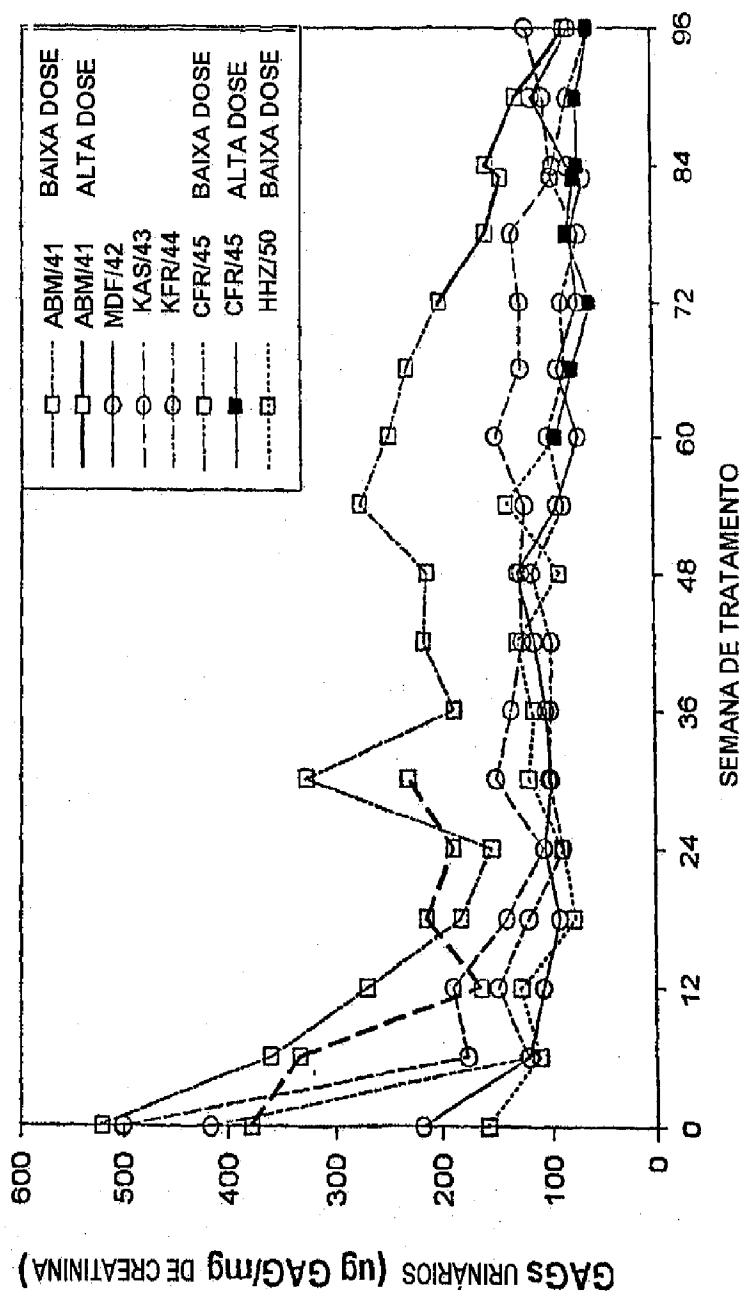


FIG. 12

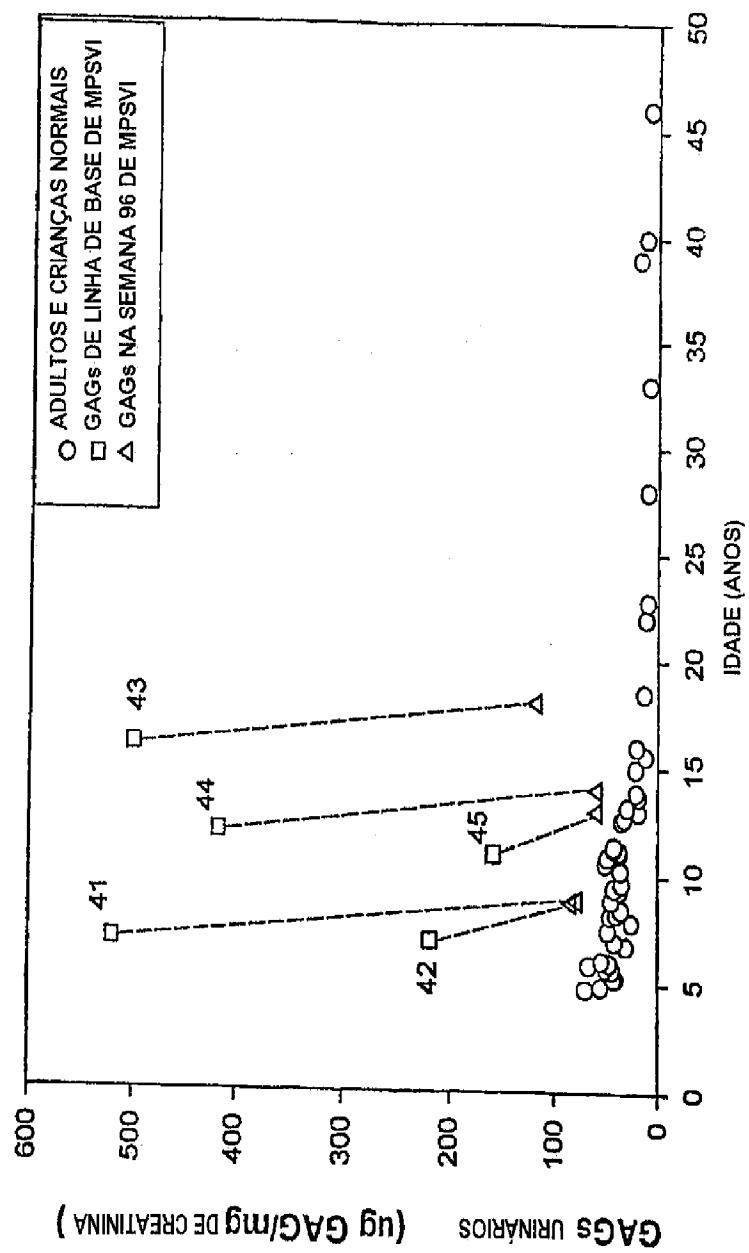


FIG. 13

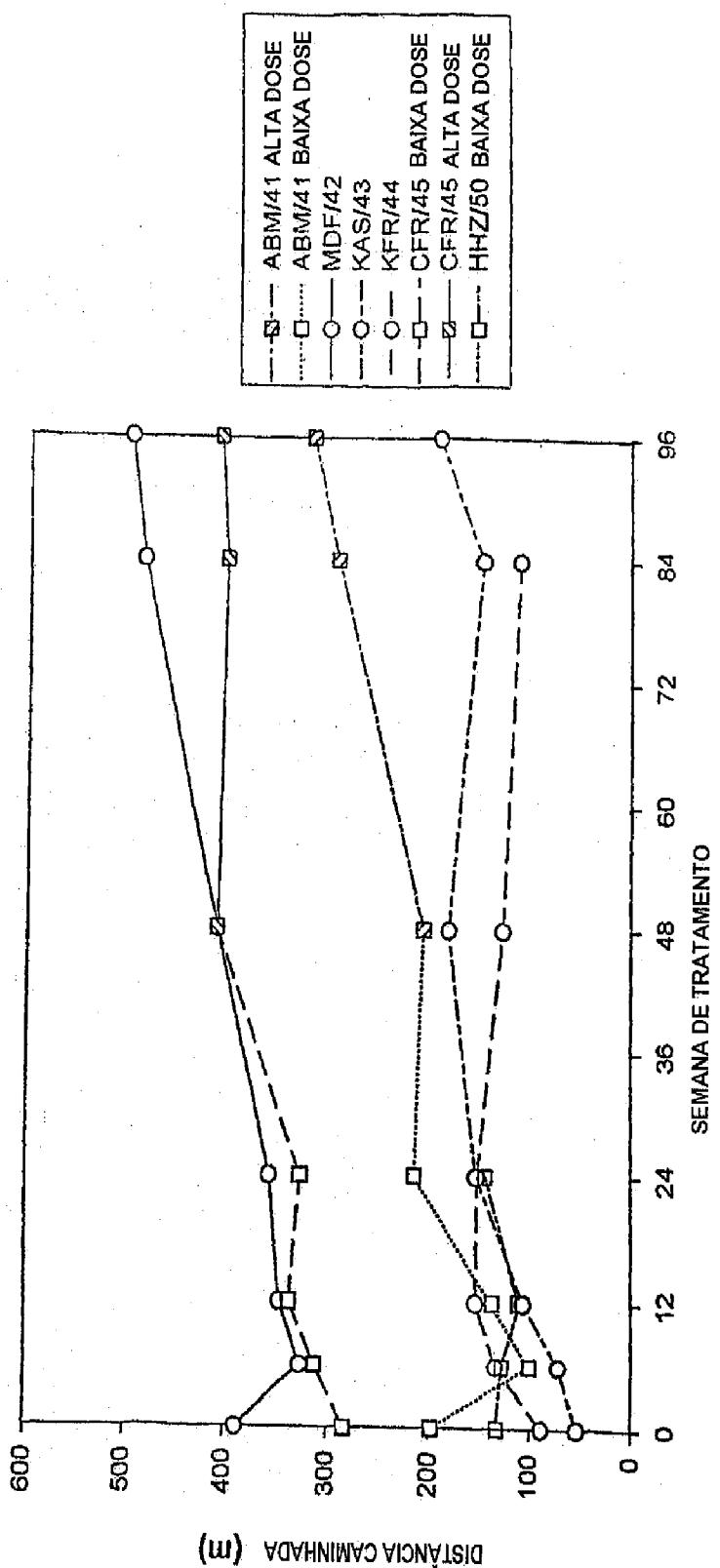


FIG. 14

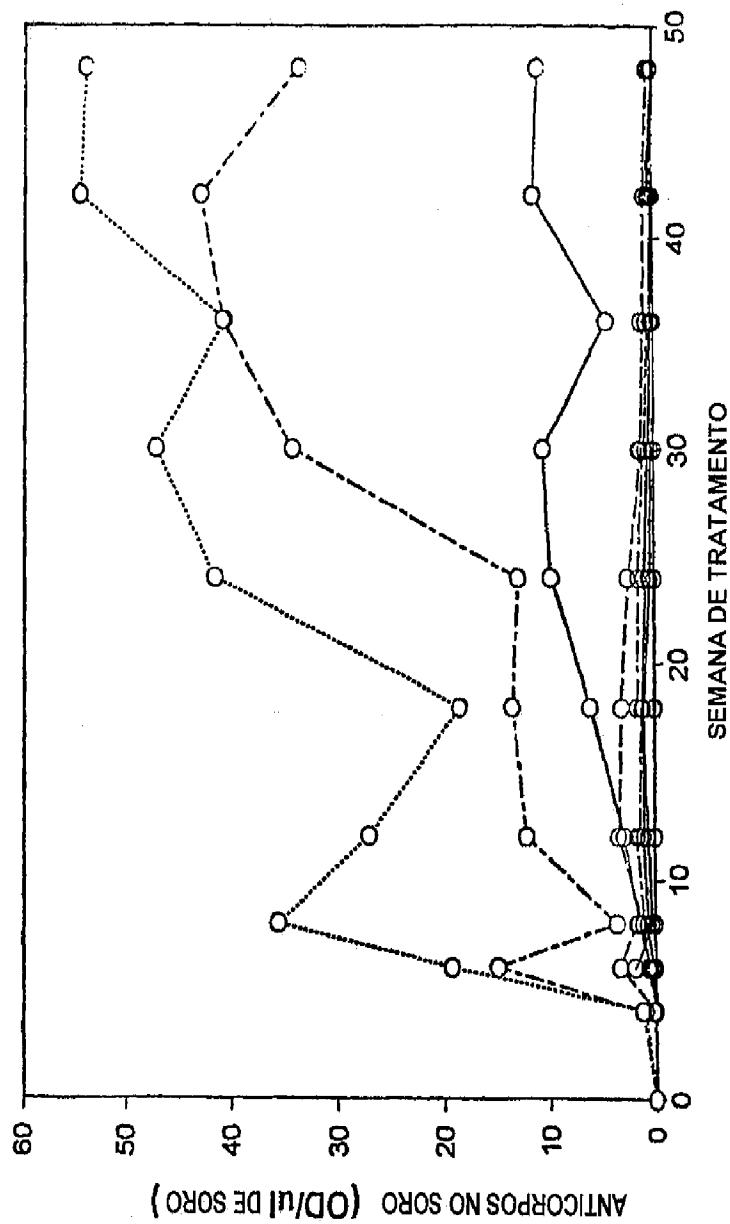


FIG. 15

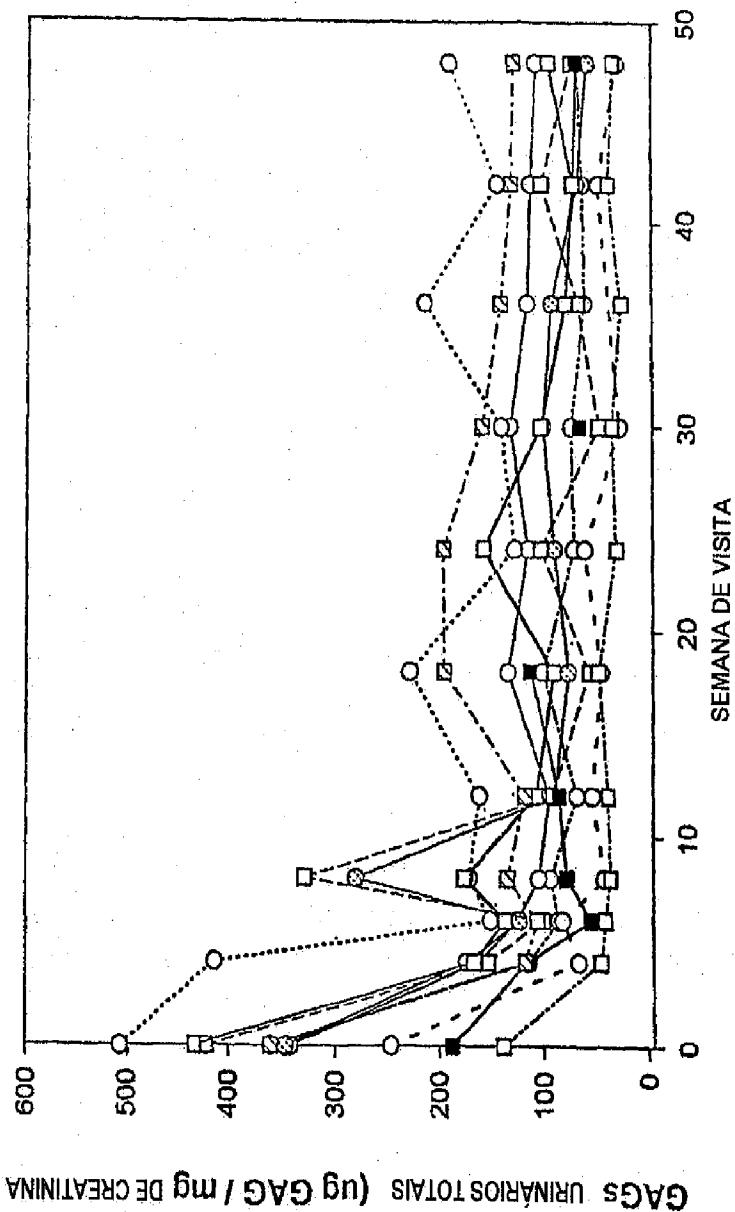


FIG. 16

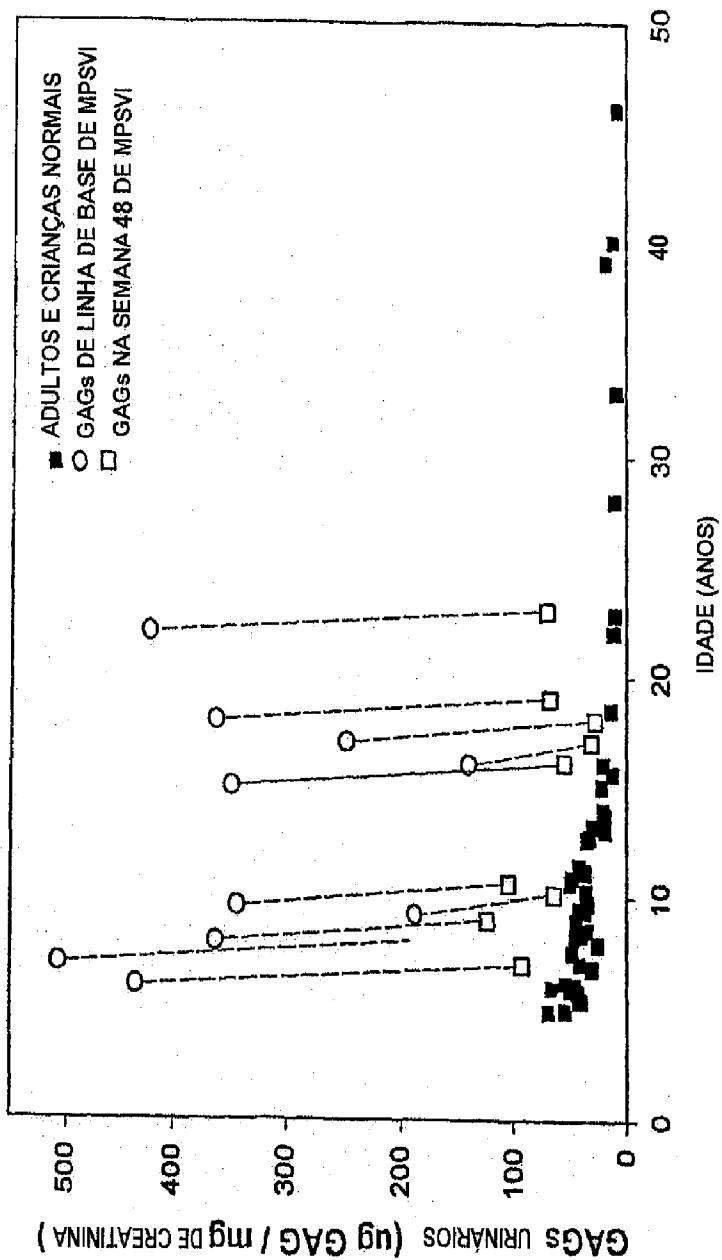


FIG. 17

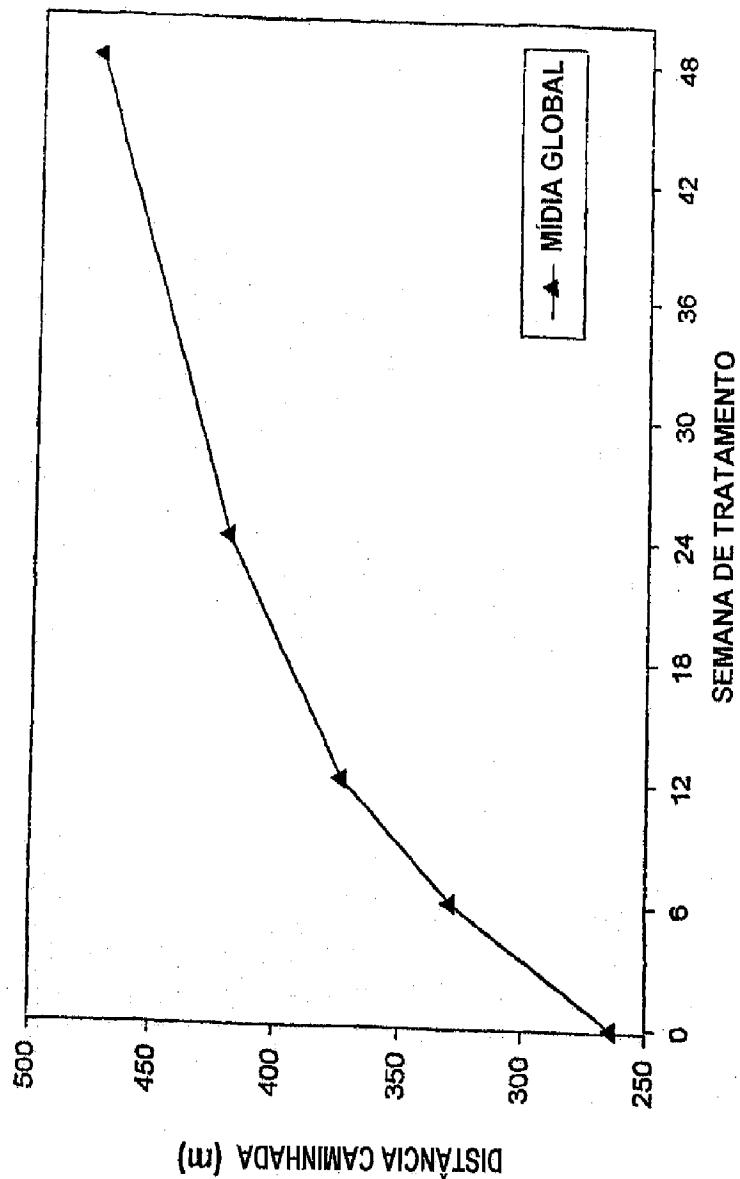


FIG. 18

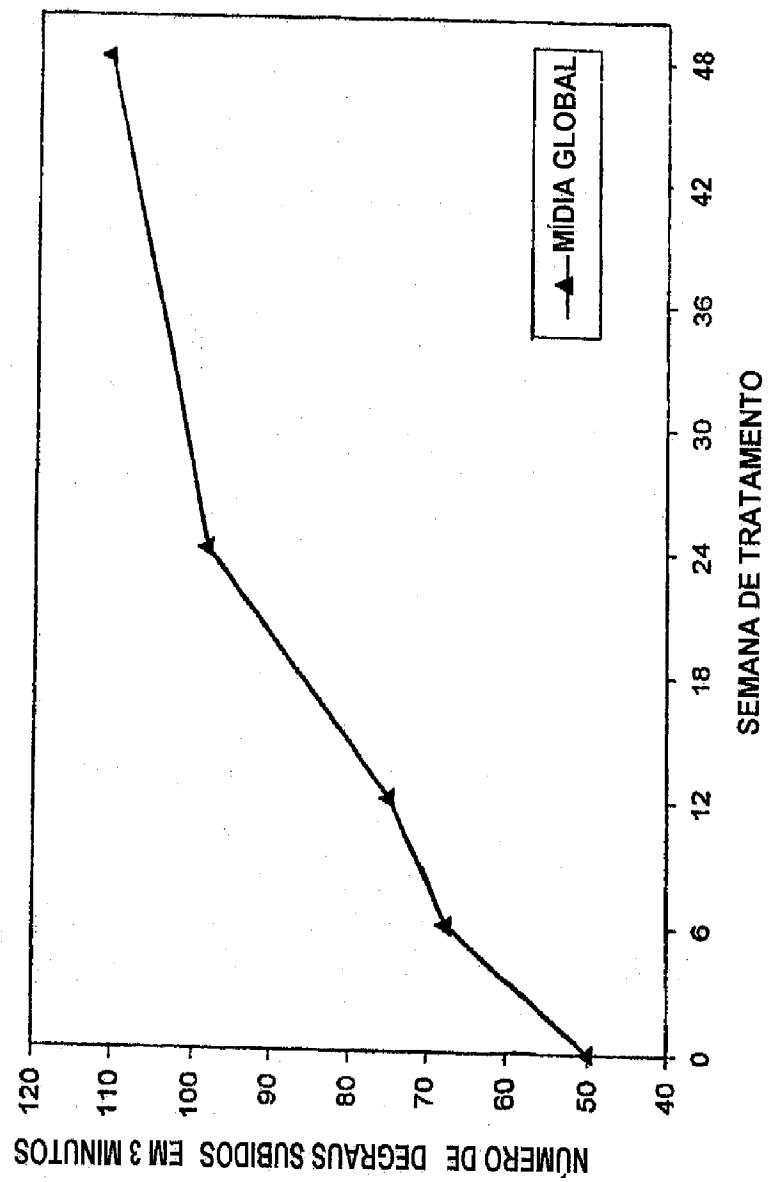


FIG. 19

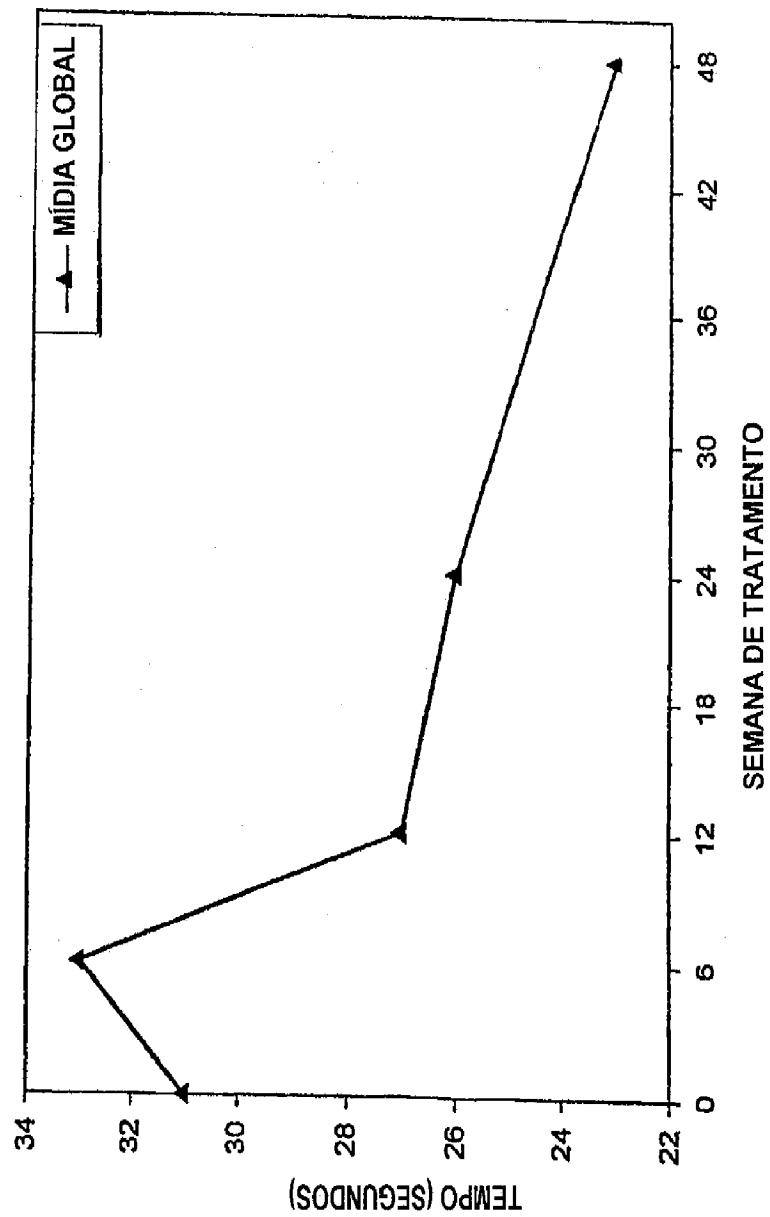


FIG. 20

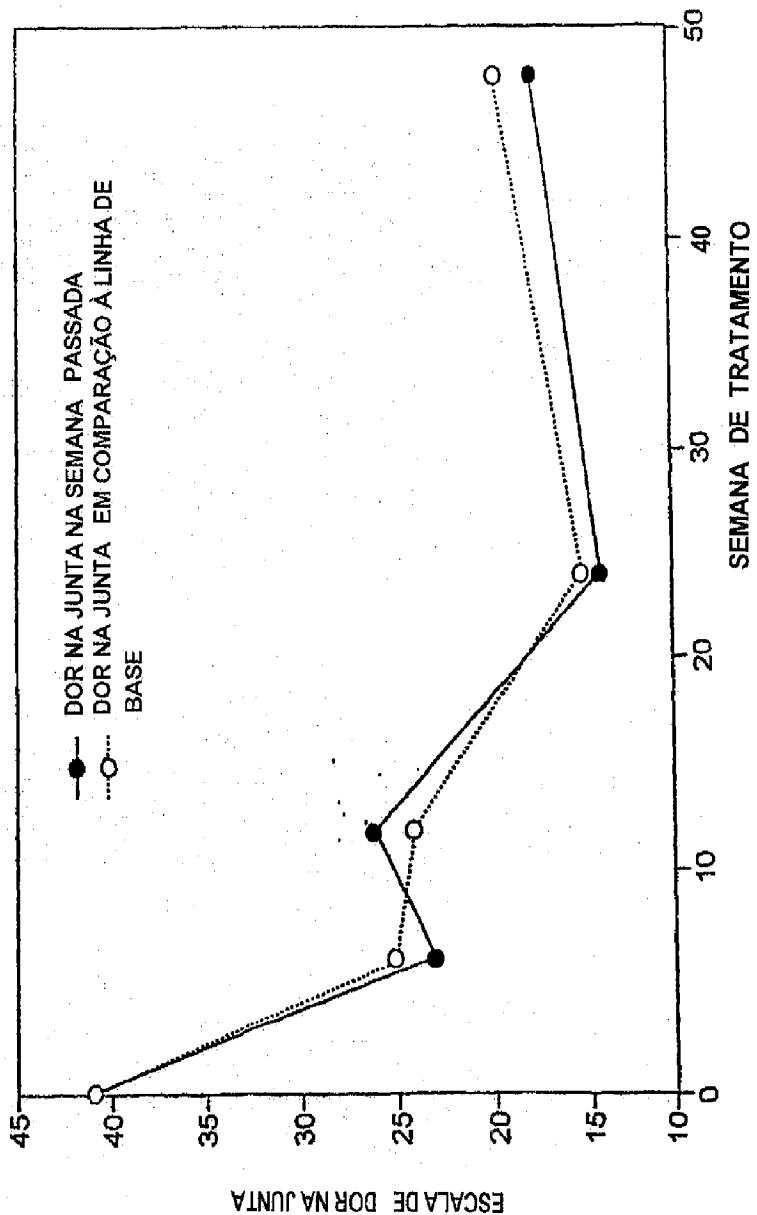


FIG. 21

