

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 846**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009** **E 16203748 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3219795**

54 Título: **Fabricación de enzimas sulfatasas lisosomales humanas, altamente fosforiladas, activas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.01.2008 US 22179 P

23.09.2008 US 99373 P

31.10.2008 US 110246 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2024

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US

72 Inventor/es:

VELLARD, MICHEL CLAUDE;
KOPPAKA, VISH;
DVORAK-EWELL, MELITA;
PUNGNOR, ERNO y
HAGUE, CHARLES

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 984 846 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fabricación de enzimas sulfatasas lisosomales humanas, altamente fosforiladas, activas y usos de las mismas

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con los campos técnicos de la biología celular y molecular y de la medicina, particularmente con la fabricación de enzimas sulfatasas lisosomales humanas, altamente fosforiladas, activas y con su uso en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal asociadas a deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal. En particular, la presente invención está relacionada con la fabricación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, altamente fosforilada, activa y con su uso en el tratamiento de la Mucopolisacaridosis IVa (MPS IVa o síndrome de Morquio A) y otras enfermedades por depósito lisosomal asociadas a una deficiencia de GALNS.

15 Antecedentes de la invención

Las enfermedades por depósito lisosomal (LSD, por las siglas en inglés *Lysosomal Storage diseases*) se producen por la deficiencia de enzimas lisosomales específicas dentro de la célula que son esenciales para la degradación de residuos celulares en el lisosoma. Una deficiencia de dichas enzimas lisosomales conduce a la acumulación en el lisosoma de "material de depósito" no degradado, que causa hinchazón y mal funcionamiento de los lisosomas y, finalmente, a daño celular y tisular. Se ha identificado una gran cantidad de enzimas lisosomales y se han correlacionado con sus enfermedades relacionadas. Una vez que se ha identificado la enzima que falta, el tratamiento puede reducirse al único problema de suministrar de un modo eficaz una enzima de reemplazo a los tejidos afectados de los pacientes.

Una forma de tratar las enfermedades por depósito lisosomal es con terapia de reemplazo enzimático (ERT, *Enzymatic Replace Therapy*) intravenosa (Kakkis, Expert Opin. Investig. Drugs 11(5): 675-685, 2002). La ERT aprovecha la vasculatura para transportar la enzima desde un único sitio de administración a la mayoría de los tejidos. Una vez que la enzima ha sido ampliamente distribuida, las células deben absorberla. La base para que se produzca la absorción en las células se encuentra en una característica exclusiva de las enzimas lisosomales. Las enzimas lisosomales constituyen una clase distinta de glicoproteínas definidas por el fosfato en la posición 6 de los restos de manosa terminales. La manosa-6-fosfato está unida con alta afinidad y especificidad por un receptor que se encuentra en la superficie de la mayoría de las células (Munier-Lehmann *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 24(1): 133-136, 1996; Marnell *et al.*, J. Cell. Biol. 99(6): 1907-1916, 1984). El receptor de manosa-6-fosfato (MPR), que tiene dos sitios de unión a manosa-6-fosfato por cadena de polipéptidos (Tong *et al.*, J. Biol. Chem. 264: 7962-7969, 1989), dirige la absorción de la enzima desde la sangre a los tejidos y después actúa como mediador en el direccionamiento intracelular al lisosoma.

La producción a gran escala de enzimas lisosomales implica la expresión en líneas celulares de mamífero. El objetivo es la secreción predominante de enzimas recombinantes en el medio de crecimiento circundante para la recogida y procesamiento aguas abajo. En un sistema ideal para la producción a gran escala de enzimas lisosomales, la enzima debería fosforilarse eficazmente y después dirigirse principalmente hacia la superficie celular (es decir, para la secreción), en lugar de principalmente al lisosoma. Como se ha descrito anteriormente, esta distribución de las enzimas fosforiladas lisosomales es exactamente lo contrario de lo que ocurre en las células normales. La fabricación de líneas celulares utilizadas para la producción de enzimas lisosomales se centra en maximizar el nivel de manosa-6-fosfato por mol de enzima, pero se caracteriza por una productividad específica baja. Intentos realizados *in vitro* para producir enzimas lisosomales que contengan altos niveles de residuos de manosa-6-fosfato han dado como resultado diversos aciertos (Canfiel *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 6.537.785). La enzima presenta *in vitro* altos niveles de manosa-6-fosfato, así como altos niveles de manosa terminal no modificada. La competición entre los receptores de manosa-6-fosfato y los de manosa para la enzima lisosomal da como resultado la necesidad de altas dosis de enzima para su eficacia y puede conducir a una mayor inmunogenicidad en detrimento del sujeto que se está tratando.

Las sulfatasas constituyen una subclase exclusiva de enzimas lisosomales. Las sulfatasas escinden ésteres sulfato de diversos sustratos, incluyendo, por ejemplo, esteroides, carbohidratos, proteoglucanos y glucolípidos. Todas las sulfatasas eucariotas conocidas contienen un resto de cisteína en su sitio catalítico. La actividad sulfatasa requiere modificación postraducciona de este resto de cisteína en C α -formilglicina (FGly). La activación enzimática postraducciona de cisteína a FGly se produce en el retículo endoplasmático en sulfatasas desplegadas inmediatamente después de la traducción, antes de dirigir las sulfatasas al lisosoma (Dierks *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11963-11968, 1997). La enzima generadora de formilglicina que cataliza esta reacción es el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1). La importancia de esta modificación postraducciona exclusiva se pone de manifiesto por el hecho de que las mutaciones en SUMF1, que producen la formación deteriorada de FGly en las enzimas sulfatasas lisosomales, causan Deficiencia Múltiple de Sulfatasa (MSD) en el hombre (Diez-Ruiz *et al.*, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 6:355-379, 2005).

Por consiguiente, la eficacia terapéutica de una preparación de enzima sulfatasa lisosomal depende del nivel de manosa-6-fosfato, y de la presencia de enzima activa en esa preparación.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un sistema eficiente y productivo para la fabricación a gran escala de

enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas, activas, para el tratamiento de trastornos por depósito lisosomal causados por, o asociados a, una deficiencia de dichas enzimas sulfatasas lisosomales.

El documento WO2005077093 describe composiciones de enzimas lisosomales altamente fosforiladas.

5

Sumario de la invención

10

15

20

La presente invención se refiere al descubrimiento de que cuando se diseña un derivado de la línea celular CHO-K1 (designado G71) que es defectuoso en la acidificación endosomal para que exprese el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano, recombinante, las células G71 modificadas producen altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes altamente fosforiladas activas, en parte, mediante la prevención de la pérdida de material hacia el compartimento lisosomal de la línea celular de fabricación. En el presente documento, se desvela una línea celular de grupo de complementación END3 que expresa conjuntamente SUMF1 humano recombinante y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, dando como resultado altos rendimientos de enzima altamente fosforilada activa. Las líneas celulares ilustrativas son G71, G71S, y derivados de las mismas, que conservan la propiedad deseada de G71, es decir, la capacidad para producir altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes altamente fosforiladas activas. Esta aplicación de una línea celular CHO-K1 modificada con el grupo de complementación END3 que expresa conjuntamente SUMF1 humano recombinante y una enzima sulfatasa lisosomal recombinante sería especialmente útil para la fabricación de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas para su uso en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal mediante terapia de reemplazo enzimático (ERT). La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

25

30

35

40

En el presente documento, también se describe un nuevo método de producción de enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes altamente fosforiladas activas o fragmentos biológicamente activos, mutantes, variantes o derivados de las mismas en una célula CHO de grupo de complementación END3 o derivado de la misma en cantidades que permiten su uso terapéutico. El método descrito en el presente documento puede comprender las etapas de: (a) cultivar una célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivado de la misma; (b) preparar un primer vector de expresión de mamífero capaz de expresar la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma en la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma; (c) preparar un segundo vector de expresión de mamífero capaz de expresar el factor de modificación 1 de sulfatasa humana recombinante (SUMF1) o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado del mismo en la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma; (d) transfectar la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma con el primer y el segundo vector de expresión; (e) seleccionar y clonar un transfectante de una célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma que exprese la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma; y (f) optimizar un método de proceso de cultivo celular para la fabricación de la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma. Las enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes se seleccionan del grupo que consiste en arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS).

45

50

55

60

El método implica las etapas de transfección de un ADNc que codifica toda o parte de la enzima sulfatasa lisosomal y un ADNc que codifica todo o parte del SUMF1 humano en una célula del grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivada de la misma. En algunas realizaciones, el primer y segundo vector de expresión, que son capaces de expresar la codificación de la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa y SUMF1 humano, respectivamente, se transfectan simultáneamente en la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el primer y segundo vector de expresión se transfectan en la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivado de la misma de forma secuencial. En algunas realizaciones, se usa un ADNc que codifica una enzima sulfatasa lisosomal humana de longitud completa, aunque en otras realizaciones también se usa un ADNc que codifica un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma. En algunas realizaciones, se usa un ADNc que codifica un SUMF1 humano de longitud completa, aunque en otras realizaciones también se usa un ADNc que codifica un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado del mismo. En algunas realizaciones, se usan múltiples vectores de expresión para transferir los ADNc de la enzima sulfatasa lisosomal humana y de SUMF1 humano de forma simultánea o secuencial en la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivado de la misma. En algunas realizaciones, se usa un solo vector de expresión para transferir los ADNc de la enzima sulfatasa lisosomal humana y de SUMF1 humano de forma simultánea en la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivado de la misma. En una realización preferida, la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o derivado de la misma es una línea celular G71, una línea celular G71S, o un derivado de G71 o de G71S.

65

En una realización preferida, el método comprende la producción de una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa, por ejemplo, la arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) o N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), de una línea celular CHO de grupo de complementación END3 o derivado de la misma. En una

realización particularmente preferida, el método comprende la producción de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa de una línea celular CHO de grupo de complementación END3 o derivado de la misma. Una línea celular de grupo de complementación END3 es cualquier línea celular CHO modificada que conserva las propiedades de una línea celular de grupo de complementación END3, tales como la acidificación endosomal defectuosa. En una realización preferida, la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o el derivado de la misma es una línea celular G71, una línea celular G71S, o un derivado de G71 o de G71S.

En el presente documento, también se desvela una línea celular de mamífero de acidificación endosomal deficiente caracterizada por su capacidad para producir enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes altamente fosforiladas activas en cantidades que permiten el uso de la enzima sulfatasa lisosomal terapéuticamente. En el presente documento, se desvelan líneas celulares de grupo de complementación END3 derivadas de CHO-K1, designadas G71, G71S, o derivados de las mismas, que son capaces de producir altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes altamente fosforiladas activas, lo que permite la producción a gran escala de dichas enzimas sulfatasas lisosomales terapéuticas. La línea celular desvelada en el presente documento puede expresar y secretar una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante en cantidades de al menos aproximadamente 0,5, preferentemente al menos aproximadamente 0,75, más preferentemente al menos aproximadamente 1,0 e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 1,25 picogramos/célula/día.

Una línea celular de grupo de complementación END3 es cualquier línea celular CHO modificada que conserva las propiedades de una línea celular de grupo de complementación END3, tales como la acidificación endosomal defectuosa. La línea celular CHO de grupo de complementación END3 se puede derivar de G71 o un derivado de la misma, y comprende (a) un vector de expresión para el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano recombinante; y (b) un vector de expresión para una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, seleccionándose la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante del grupo que consiste en arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS). La línea celular CHO de grupo de complementación END3 puede comprender el vector de expresión para la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) recombinante humana. La línea celular CHO de grupo de complementación END3 puede expresar y secretar GALNS humana recombinante. La línea celular CHO de grupo de complementación END3 se puede seleccionar del grupo que consiste en el clon 4, clon 5, clon C6, clon C2, clon C5, clon C7, clon C10, clon C11 y clon C30. La línea celular CHO de grupo de complementación END3 puede ser el clon C2. La línea celular CHO de grupo de complementación END3 se puede adaptar al crecimiento en suspensión.

En el presente documento, también se desvelan enzimas sulfatasas lisosomales producidas de acuerdo con los métodos mostrados de la presente invención y, por lo tanto, presentes en cantidades que permiten el uso de las enzimas sulfatasas lisosomales terapéuticamente. Las enzimas sulfatasas lisosomales pueden ser proteínas de longitud completa, o fragmentos, mutantes, variantes o derivados de las mismas. En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal o fragmento, mutante, variante o derivado de la misma de acuerdo con la invención se pueden modificar como se desee para mejorar sus propiedades de estabilidad o farmacocinéticas (por ejemplo, PEGilación, mutagénesis, fusión, conjugación). La enzima descrita en el presente documento puede ser una enzima sulfatasa lisosomal humana, un fragmento de la enzima sulfatasa lisosomal humana que tiene una actividad biológica de una enzima sulfatasa nativa o un polipéptido que tiene homología sustancial de secuencia de aminoácidos con la enzima sulfatasa lisosomal humana. La enzima sulfatasa lisosomal descrita en el presente documento puede ser una proteína de secuencia, origen o derivación humana o de mamífero. En otras realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal es aquella que su deficiencia cause una enfermedad humana, tal como leucodistrofia metacromica o MLD (es decir, la arilsulfatasa A (ARSA)), síndrome de Maroteaux-Lamy o MPS VI (es decir, arilsulfatasa B (ARSB)), síndrome de Hunter o MPS II (es decir, iduronato-2-sulfatasa (IDS)), síndrome de Sanfilippo A o MPS IIIa (es decir, sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH)), síndrome de Sanfilippo D o MPS IIIc (es decir, N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S)) y síndrome de Morquio A o MPS IVa (es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)). En una realización particularmente preferida, la enzima sulfatasa lisosomal es aquella que su deficiencia provoca el síndrome de Morquio A o MPS IVa (es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)). La enzima sulfatasa lisosomal descrita en el presente documento puede ser aquella que su deficiencia se asocia con una enfermedad humana, tal como deficiencia múltiple de sulfatasa o MSD (es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS)).

La enzima sulfatasa lisosomal es de origen o de derivación de secuencia humana. En otras realizaciones más de la invención, en cada uno de sus aspectos, la enzima sulfatasa lisosomal es idéntica en secuencia de aminoácidos a la parte correspondiente de una secuencia de aminoácidos de la enzima sulfatasa lisosomal humana. En otras realizaciones, la fracción de polipéptido es la enzima sulfatasa lisosomal nativa de ser humano. En otras realizaciones, el polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal es esencialmente homólogo (es decir, al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos) a lo largo de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 150 o 200 aminoácidos, o a lo largo de todo el polipéptido, con la secuencia de aminoácidos de la enzima sulfatasa lisosomal nativa de la enzima humana. En otras realizaciones, el sujeto al que se va a administrar la enzima sulfatasa lisosomal es un ser humano.

La enzima sulfatasa lisosomal descrita en el presente documento puede ser una enzima sulfatasa lisosomal humana

recombinante altamente fosforilada producida por una línea celular deficiente en la acidificación endosomal, por ejemplo, una línea celular de grupo de complementación END3 derivada de CHO. Una línea celular de grupo de complementación END3 es cualquier línea celular CHO modificada que conserva las propiedades de una línea celular de grupo de complementación END3, tales como la acidificación endosomal defectuosa. En una realización preferida, la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO, o derivado de la misma es una línea celular G71, una línea celular G71S, o un derivado de G71 o de G71S.

La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante descrita en el presente documento puede tener un alto nivel de oligosacáridos fosforilados (es decir, superior a aproximadamente 0,25, preferentemente superior a 0,5 y más preferentemente superior a aproximadamente 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforilada por cadena de proteína). La enzima puede ser una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada.

La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante descrita en el presente documento puede tener al menos aproximadamente del 50 %, preferentemente al menos del aproximadamente 70 %, más preferentemente al menos del aproximadamente 90 %, incluso más preferentemente al menos del aproximadamente 95 % de conversión del resto de cisteína del sitio activo en C α -formilglicina (FGly). La enzima puede ser una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante activa.

La enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante puede tener un alto nivel de oligosacáridos fosforilados (es decir, superior a aproximadamente 0,25, preferentemente superior a 0,5 y más preferentemente superior a aproximadamente 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforilada por cadena de proteína) y una alto porcentaje (es decir, al menos del aproximadamente 50 %, preferentemente al menos del aproximadamente 70 %, más preferentemente al menos del aproximadamente 90 %, incluso más preferentemente al menos del aproximadamente 95 %) de conversión del resto de cisteína del sitio activo en C α -formilglicina (FGly). En realizaciones más particularmente preferidas, la enzima es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa.

En el presente documento, también se describe un método para purificar enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes producidas mediante los métodos de la presente invención. Las enzimas sulfatasas lisosomales se pueden purificar usando un proceso de dos columnas (cromatografía de colorante-ligando, por ejemplo, Blue-Sepharose, y cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, SE Hi-Cap) que comprende al menos cinco etapas de purificación: (1) filtrar la lo recogido, es decir, el medio de cultivo de una línea celular CHO de grupo de complementación END3 o derivado de la misma que expresa el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante; (2) ajustar el pH de la lo recogido filtrada a pH 4,5 (para inducir la precipitación de proteínas contaminantes); (3) cargar la lo recogido filtrada de pH ajustado en una columna de colorante-ligando, por ejemplo, la columna Blue-Sepharose, lavando la columna y eluyendo la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; (4) cargar la sustancia eluida de la columna de colorante-ligando en una columna de intercambio aniónico, por ejemplo, columna de SE Hi-Cap, lavando la columna y eluyendo la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; y (5) someter la sustancia eluida del intercambio de aniones a ultrafiltración y diafiltración. Opcionalmente, la lo recogido filtrada en la etapa (1) se concentra de 10 a 20 veces por ultrafiltración antes de ajustar el pH. Opcionalmente, la enzima sulfatasa lisosomal ultrafiltrada y diafiltrada en la etapa (5) se formula en un tampón de formulación. En una realización particularmente preferida, la enzima lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante.

Las enzimas sulfatasas lisosomales se pueden purificar usando un proceso de tres columnas (cromatografía de captura, por ejemplo, SE Hi-Cap de intercambio aniónico; cromatografía intermedia, por ejemplo, de colorante-ligando Capto BlueZinc, Sepharose FF quelante o Capto Adhere; y cromatografía de pulido, por ejemplo, ToyoPearl Butyl 650M, Phenyl Sepharose Hi-Sub o Phenyl Sepharose Low-Sub) que comprende al menos cinco etapas de purificación:

(1) ultrafiltrar lo recogido, es decir, el medio de cultivo de una línea celular CHO de grupo de complementación END3 o derivado de la misma que expresa el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, mediante, por ejemplo, casetes de Sartoon, (10 kDa, Hydrosart); (2) ajustar el pH de lo recogido filtrado a pH 4,5 (para inducir la precipitación de proteínas contaminantes); (3) cargar lo recogido filtrado de pH ajustado en una columna de captura, por ejemplo, de intercambio aniónico Fractogel EMD SE Hi-CAP (M), lavando la columna y eluyendo la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; (4) cargar la sustancia eluida de la columna de captura en una columna intermedia, por ejemplo, colorante-ligando Capto BlueZinc, Sepharose FF quelante o Capto Adhere, lavando la columna y eluyendo la enzima sulfatasa lisosomal de la columna; y (5) cargar la sustancia eluida en una columna de pulido, por ejemplo, ToyoPearl Butyl 650M, Phenyl Sepharose Hi-Sub o Phenyl Sepharose Low-Sub, lavando la columna y eluyendo la enzima lisosomal de la columna. La enzima lisosomal eluida de la etapa (5) se formula en un tampón de formulación. Opcionalmente, la enzima sulfatasa lisosomal eluida de la etapa (5) se somete a ultrafiltración y luego se formula en un tampón de formulación. Opcionalmente, la enzima sulfatasa lisosomal de la columna de la etapa (4) se expone a pH 3,5 para la inactivación vírica de pH bajo antes de cargarla en la columna de pulido en la etapa (5). En una realización particularmente preferida, la enzima lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante.

En el presente documento, también se describe una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa o mutante biológicamente activo, variante o derivado de la misma útiles para tratar un sujeto

que padece una enfermedad por depósito lisosomal que está causada por (por ejemplo, mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A) o asociada con (por ejemplo, deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD)) una deficiencia en la enzima GALNS. En una realización preferida, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada: (a) tiene una pureza de al menos aproximadamente el 90 %, determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras; (b) tiene al menos aproximadamente un 90 % de conversión del resto de cisteína de la posición 53 en C α -formilglicina (FGly); y (c) está glicosilada ligada a N en los restos de asparagina de las posiciones 178 y 397, en la que al menos aproximadamente el 50 % de las cadenas de oligomanosa unidas al resto de asparagina de la posición 178 están bis-fosforiladas. La GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, consiste en una banda principal de aproximadamente 55-60 kDa (es decir, siendo la GALNS humana precursora al menos aproximadamente un 75 %, preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % e incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de las proteínas visibles) y bandas menores a ~39 kDa y ~19 kDa (es decir, GALNS humana madura o procesada de menos de aproximadamente un 25 %, preferentemente menos de aproximadamente un 15 %, más preferentemente menos de aproximadamente un 10 % e incluso más preferentemente menos de aproximadamente un 5 % de las proteínas visibles) cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras. En una realización particularmente preferida, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, consiste esencialmente en una única banda de aproximadamente 55 a 60 kDa (es decir, GALNS humana precursora) cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras. En una realización, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, es útil para tratar la MPS IVa o el síndrome de Morquio A. En una realización, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, es útil para el tratamiento del MSD.

En el presente documento, también se desvela un método de tratamiento de enfermedades causadas completamente o en parte por la deficiencia, o que están asociadas a una deficiencia, de una enzima sulfatasa lisosomal. El método comprende la administración de una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante terapéutica producida por los métodos de la presente invención, en el que la enzima sulfatasa lisosomal se une a un receptor de MPR y se transporta a través de la membrana celular, entra en la célula y se suministra a los lisosomas dentro de la célula.

El método puede comprender el tratamiento de un sujeto que padece una deficiencia de una enzima sulfatasa lisosomal que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha enzima sulfatasa lisosomal, en el que dicha enzima sulfatasa lisosomal es una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante o fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma, producidos por una célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma. El método puede comprender la administración de una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante terapéutica, o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma, solos o en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las realizaciones preferidas incluyen optimizar la dosis a las necesidades de los sujetos a tratar, para mejorar de la forma más efectiva la deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal.

Dichas enzimas sulfatasas lisosomales terapéuticas son particularmente útiles, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades por depósito lisosomal causadas por una deficiencia de una enzima sulfatasa lisosomal, tales como los pacientes que padecen leucodistrofia metacromática o MLD, mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) o síndrome de Maroteaux-Lamy, mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis de tipo IIIa (MPS IIIa) o síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IIId (MPS IIId) o síndrome de Sanfilippo D y mucopolisacaridosis de tipo IV (MPS IVa) o síndrome de Morquio A. En una realización preferida, la enfermedad por depósito lisosomal es MPS IVa o síndrome de Morquio A y la enzima sulfatasa lisosomal es N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante. En el presente documento, también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden la enzima sulfatasa lisosomal deficiente causante de la enfermedad por depósito lisosomal y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El método puede comprender el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad por depósito lisosomal que está asociada con una deficiencia en una o más enzimas sulfatasas lisosomales que comprenden administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una enzima sulfatasa lisosomal, en el que dicha enzima sulfatasa lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana recombinante (GALNS) o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma, producidos por una célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma. El método puede comprender la administración de la enzima GALNS humana recombinante terapéutica o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma, sola o en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particularmente preferida, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD).

En realizaciones particularmente preferidas, la célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma es una línea celular G71, una línea celular G71S, o un derivado de G71 o de G71S de la misma.

En el presente documento, también se desvela un método de terapia de reemplazo enzimático mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de enzima sulfatasa lisosomal a un sujeto en necesidad de la terapia de reemplazo enzimático, en el que las células del paciente tienen lisosomas que contienen cantidades insuficientes de la enzima sulfatasa lisosomal para prevenir o reducir el daño a las células, por lo que cantidades suficientes de la enzima sulfatasa lisosomal entran en los lisosomas para prevenir o reducir el daño a las células. Las

células pueden estar dentro o fuera del SNC o necesitan no proceder de la sangre por las paredes capilares cuyas células endoteliales están estrechamente selladas a la difusión de un agente activo mediante uniones estrechas.

En el presente documento, también se desvelan composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante activa que tiene una actividad biológica que es reducida, deficiente o está ausente en el lisosoma diana y que se administra al sujeto. Las enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes activas preferidas incluyen, pero sin limitación, la arilsulfatasa A, arilsulfatasa B, iduronato-2-sulfatasa, sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. La N-acetilglucosamina-6-sulfatasa es la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante activa.

En el presente documento, también se desvela un método de tratamiento de un sujeto que padece MPS IVa o síndrome de Morquio A, o MSD, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, en el que la GALNS humana recombinante tiene un alto nivel de conversión del resto de cisteína del sitio activo en C α -formilglicina (FGly) (es decir, al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de conversión) y altos niveles de fosforilación (es decir, más de aproximadamente 0,25, preferentemente más de 0,5 y más preferentemente más de aproximadamente 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína).

En el presente documento, también se muestra un método de tratamiento de un sujeto que padece MPS IVa o síndrome de Morquio A, o MSD, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, producida por células del grupo de complementación END3, en el que la GALNS humana recombinante tiene un alto nivel de conversión del resto de cisteína del sitio activo en C α -formilglicina (FGly) (es decir, al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de conversión), y altos niveles de fosforilación (es decir, más de aproximadamente 0,25, preferentemente más de 0,5 y más preferentemente más de aproximadamente 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína).

En el presente documento, también se muestra un método de tratamiento de un sujeto que padece MPS IVa o síndrome de Morquio A, o MSD, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, que: (a) tiene una pureza de al menos aproximadamente un 90 %, determinada por tinción con azul de Coomassie cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones no reductoras; (b) tiene al menos aproximadamente un 90 % de conversión del resto de cisteína de la posición 53 en C α -formilglicina (FGly); y (c) está glicosilada ligada a N en los restos de asparagina de las posiciones 178 y 397, estando al menos aproximadamente el 50 % de las cadenas de oligomanosa unidas al resto de asparagina de la posición 178 bis-fosforiladas. La GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, consiste en una banda principal de aproximadamente 55 a 60 kDa (es decir, GALNS humana precursora que es al menos aproximadamente un 75 %, preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % e incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de las proteínas visibles) y bandas menores a ~39 kDa y ~19 kDa (es decir, GALNS humana madura o procesada que es menos del aproximadamente 25 %, preferentemente menos del aproximadamente 15 %, más preferentemente menos del aproximadamente 10 % e incluso más preferentemente menos del aproximadamente 5 % de las proteínas visibles) cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras. En una realización más particularmente preferida, la GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa, purificada, consiste esencialmente en una única banda de aproximadamente 55 a 60 kDa (es decir, GALNS humana precursora) cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras.

El sujeto puede padecer MPS IVa o el síndrome de Morquio A. El sujeto puede padecer MSD.

También se contempla en la divulgación el uso correspondiente de las enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas de la invención, que se producen preferentemente mediante los métodos de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades por depósito lisosomal descritas anteriormente.

En el presente documento, también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa como se describe anteriormente en el presente documento que es útil para el tratamiento de enfermedades causadas completamente o en parte por, o que están asociadas a la deficiencia en dicha enzima sulfatasa lisosomal, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma, producidos mediante los métodos de la invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para la administración por varias vías tales como la administración intratecal, parenteral, tópica, intranasal, por inhalación u oral. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración parenteral.

En el presente documento, también se muestra un método de detección de la actividad de una enzima sulfatasa

lisosomal que comprende (a) cultivar condrocitos de un paciente que padece deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal, por ejemplo, un paciente que padece el síndrome de Morquio, en condiciones que potencien el mantenimiento de la diferenciación de los condrocitos; (b) poner en contacto los condrocitos con una enzima sulfatasa lisosomal que degrade el queratán sulfato; y (c) detectar los niveles de queratán sulfato en las células, en el que un nivel de queratán sulfato reducido en células puestas en contacto con la enzima sulfatasa lisosomal en comparación con células no puestas en contacto con la enzima sulfatasa lisosomal es indicativo de actividad de la enzima sulfatasa lisosomal. En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal es N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS). El cultivo se puede llevar a cabo en medios que comprenden el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGFI), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), transferrina, insulina y ácido ascórbico. El queratán sulfato se puede detectar por microscopía confocal, o mediante la unión a anticuerpo anti-queratán sulfato. El método puede llevarse a cabo con cualquier enzima sulfatasa lisosomal, incluyendo enzima humana natural o recombinante, o fragmentos o variantes de la misma, incluyendo las variantes que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la enzima humana precursora, sin secuencia señal, o la forma madura de la misma.

En el presente documento, también se muestra un ensayo basado en células para medir la actividad de una enzima lisosomal humana recombinante para degradar sustratos naturales. El método comprende (a) cultivar una célula humana aislada deficiente en la enzima lisosomal en condiciones en las que los sustratos naturales para el acumulado enzima lisosomal; (B) poner en contacto la célula con la enzima lisosomal; (C) lisar la célula; (D) añadir a la célula lisada una enzima que (i) es específico para los sustratos naturales, y (ii) escinde pequeños oligosacáridos de los sustratos naturales; (E) el marcaje de los pequeños oligosacáridos con un resto detectable; (F) opcionalmente separar los pequeños oligosacáridos marcados; (G) detectar los oligosacáridos pequeños marcados; y (h) determinar la actividad de la enzima lisosomal para degradar los sustratos naturales mediante la comparación de (i) la cantidad de pequeño oligosacárido marcado a partir de células en contacto con la enzima lisosomal con (ii) la cantidad de pequeños oligosacáridos marcados a partir de células no en contacto con el enzima lisosomal, en el que una reducción en (h) (i) en comparación con (h) (ii) indica la actividad de la enzima lisosomal para degradar sustratos naturales. El oligosacárido pequeño puede ser un mono-, di- o tri-sacárido. El oligosacárido pequeño puede ser un disacárido. En algunas realizaciones, la enzima lisosomal se selecciona del grupo que consiste en arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS). La enzima lisosomal puede ser α -L-iduronidasa (IDU). La enzima lisosomal puede ser α -glucosidasa ácida (GAA). La enzima lisosomal puede ser β -glucuronidasa (GUSB). La enzima lisosomal puede ser β -galactosidasa (GLB1).

Las células humanas adecuadas que se pueden usar en el ensayo basado en células incluyen cualquier célula humana que sea deficiente en la enzima lisosomal que se vaya ensayar, de manera que se puedan acumular los sustratos naturales para la enzima lisosomal. Por ejemplo, se pueden usar las células que presentan de forma natural una deficiencia total (100 %) o parcial de la actividad, por ejemplo, una reducción del 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o superior de la actividad. Se pueden usar células que expresen una enzima mutante con actividad disminuida, o células derivadas de pacientes que padecen una enfermedad por depósito lisosomal, por ejemplo, una mucopolisacaridosis. Se pueden usar células modificadas de forma recombinante para desactivar o reducir la actividad de la enzima lisosomal, por ejemplo, a través de la introducción de una mutación en el gen codificante o su promotor u otra región reguladora. Se pueden usar células tratadas para reducir la actividad de la enzima lisosomal, por ejemplo, tratadas con antisentido o ARNi para reducir la expresión de la enzima.

Las enzimas adecuadas que escinden (digieren) oligosacáridos pequeños de hidratos de carbono y que son "específicas de" (es decir, que digieren predominantemente) los sustratos naturales de la enzima lisosomal pueden ser seleccionadas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para la detección de la actividad de GALNS o GLB1 (enzimas que degradan el queratán sulfato), la enzima de la etapa (d) puede ser queratanasa II o cualquier enzima que actúe principalmente sobre el queratán sulfato. Como otro ejemplo, para la detección de IDU, ARSB, IDS o GUSB (las enzimas que degradan el sulfato de dermatán), la enzima de la etapa (d) puede ser condroitinasa ABC o cualquier enzima que actúe principalmente sobre el sulfato de dermatán. Como otro ejemplo, para la detección de IDU, IDS, SGHS, G6S o GUSB (las enzimas que degradan el sulfato de heparano), la enzima de la etapa (d) puede ser heparanasa I o heparanasa II, o ambas. Como otro ejemplo más, para la detección de GAA (una enzima que degrada el glicógeno), la enzima de la etapa (d) puede ser α -amilasa o cualquier enzima que actúa principalmente en el glicógeno.

Este método basado en células es capaz de tener una gran sensibilidad en la detección de la actividad de la enzima lisosomal. La actividad de la enzima lisosomal puede ser detectable cuando la concentración de enzima lisosomal es tan baja como de aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 5 nM, o aproximadamente 1 nM, o aproximadamente 0,75 nM, o aproximadamente 0,5 nM, o aproximadamente 0,25 nM, o aproximadamente 0,1 nM, o aproximadamente 0,05 nM, o aproximadamente 0,01 nM, o aproximadamente 0.005 nM, o aproximadamente 1 pM, o aproximadamente 0,5 pM.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 describe la secuencia de nucleótidos del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 describe la secuencia de nucleótidos del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano (SEQ ID

NO: 2).

La Figura 3 describe la secuencia de nucleótidos de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana (SEQ ID NO: 3).

La Figura 4 describe la secuencia de nucleótidos de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana (SEQ ID NO: 4). El péptido señal de 26 aminoácidos en el extremo N-terminal está ausente en la GALNS procesada.

La Figura 5 representa la estructura y las características de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana procesada (SEQ ID NO: 5).

La Figura 6 muestra la expresión de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana de células G71S cotransfectadas con factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y con vectores de expresión de GALNS humana. (A) Exploración del clon G71S en busca de GALNS activa en 96 pocillos. (B) Productividad de GALNS del clon G71S en picogramos por célula al día.

La Figura 7 ilustra un esquema del controlador del biorreactor WAVE usado para la producción a gran escala de células G71S que expresan la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana y variantes de la misma.

La Figura 8 muestra la estabilidad de la actividad de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana purificada tras el almacenamiento a 4 °C (diamantes) o a -70 °C (triángulos).

La Figura 9 muestra la purificación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana mediante (A) cromatografía de flujo rápido Blue Sepharose 6 seguido de cromatografía (B) cromatografía Fractogel SE Hi-CAP. La pureza se determinó mediante tinción con azul de Coomassie de SDS-PAGE (izquierda) y mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-GALNS (IVA) (derecha).

La Figura 10 muestra la purificación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), cromatografía Fractogel SE Hi-Cap, cromatografía Sepharose quelante de Zn y cromatografía ToyoPearl Butyl 650M. La pureza se determina mediante tinción de azul de Coomassie de SDS-PAGE (parte superior izquierda) y mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-GALNS (parte superior derecha), un anticuerpo anti-catepsina L (parte inferior izquierda) y un anti-CHOP (proteínas de células de ovario de hámster chino (parte inferior derecha)).

La Figura 11 muestra una reducción dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato de sulfato de dermatán observada en las células GM01391 tratadas con IDU.

La Figura 12 muestra una reducción dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato de sulfato de dermatán observada en las células GM00519 tratadas con ARSB.

La Figura 13 muestra la absorción de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana, ya sea sin marcar (círculos) o conjugada con A488 (cuadrados) o A555 (triángulos), por sinoviocitos cultivados.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de un método que reconcilia la necesidad de fabricar a gran escala enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes con la necesidad de obtener un producto de enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada, activa, que sea eficaz en lisosomas diana y que sea por tanto terapéuticamente eficaz.

La eficacia terapéutica de un preparado de enzima lisosomal depende del nivel de manosa-6-fosfato de dicho preparado. El fosfato se añadió a la glicoproteína diana mediante una modificación posterior a la traducción en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi temprano. Las enzimas lisosomales plegadas muestran un determinante terciario único que es reconocido por una enzima de modificación de oligosacáridos. El determinante se compone de un conjunto de lisinas espaciadas específicamente y se encuentra en la mayoría de las enzimas lisosomales a pesar de la ausencia de homología de secuencia primaria. La enzima de modificación, UDP-GlcNAc fosfotransferasa, se une al determinante proteico y añade GlcNAc-1-fosfato a la posición 6 de los restos de manosa terminales en los oligosacáridos próximos al sitio de unión; a continuación, una segunda enzima, la fosfodiéster α -GlcNAcase, escinde el enlace de GlcNAc-fosfato para dar un oligosacárido terminal de manosa-6-fosfato (Canfield *et al.*, patente de EE.UU. nº 6.537.785). El fin de la modificación de manosa-6-fosfato es desviar las enzimas lisosomales de la vía secretora hacia la vía lisosomal dentro de la célula. La enzima portadora de manosa-6-fosfato está unida por la MPR en el aparato de Golgi trans y se encamina a los lisosomas en lugar de la superficie celular.

Además de la presencia del marcador de manosa-6-fosfato en los oligosacáridos de enzimas lisosomales, el encaminamiento lisosomal de las enzimas depende de la acidificación de los endosomas de tráfico emergentes del extremo de la pila de Golgi trans. La inactivación química del entorno ácido dentro de estos endosomas con moléculas básicas difusibles da lugar a la devolución de los contenidos vesiculares, incluyendo las enzimas lisosomales, en el

medio extracelular (Bräulke *et al.*, *Eur. J. Cell Biol.* 43(3): 316-321, 1987). La acidificación requiere una ATPasa vacuolar específica embebida dentro de la membrana del endosoma (Nishi *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(2): 94-103, 2002). Se espera que la insuficiencia de esta ATPasa potencie la secreción de enzimas lisosomales a expensas del encaminamiento lisosomal. Cabría esperar que las líneas celulares de fabricación que portan defectos en la ATPasa vacuolar evitaran el desvío no productivo de la enzima recombinante fosforilada hacia el compartimento lisosomal intracelular.

En 1984, se generaron y se caracterizaron mutantes de células de ovario de hámster chino (CHO) específicamente defectuosas en la acidificación endosomal (Park *et al.*, *Somat. Cell Mol. Genet.* 17(2): 137-150, 1991). Se sometieron las células CHO-K1 a mutagénesis químicamente y se seleccionaron para la supervivencia a temperaturas elevadas en presencia de toxinas. Estas toxinas requerían la acidificación endosomal para la plena expresión de su letalidad (Marnell *et al.*, *J. Cell. Biol.* 99(6): 1907-1916, 1984). En el primer estudio, se escogió un cóctel de dos toxinas con diferentes mecanismos de acción para evitar la selección de la resistencia específica de la toxina. El principio es que aunque la probabilidad de mutaciones fortuitas que producen resistencia a una toxina particular es pequeña, la probabilidad de dos mutaciones fortuitas simultáneas específicas para dos toxinas totalmente diferentes no existe. Las selecciones se llevaron a cabo a temperatura elevada para permitir mutaciones sensibles a la temperatura. Esta selección genética dio lugar a dos mutantes, uno de los cuales fue designado G.7.1 (G71), que eran resistentes a las toxinas a temperaturas elevadas. La lesión en G71 no se debió a la absorción ni al mecanismo de acción de las dos toxinas, sino que se debió a la incapacidad del clon para acidificar los endosomas a temperaturas elevadas. Dicha incapacidad también fue evidente a temperaturas permisivas (34 °C), aunque en menor medida. También se encontraron células G71 autotróficas para el hierro a temperaturas elevadas, a pesar de la absorción normal de la transferrina del medio (Timchak *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261(30): 14154-14159, 1986). Puesto que el hierro solo se liberó de la transferrina a un pH bajo, la auxotrofia para el hierro a pesar de la absorción normal de transferrina indicó una insuficiencia en la acidificación del endosoma. Otro estudio demostró que el defecto de acidificación se manifestó principalmente en los endosomas en lugar de los lisosomas (Stone *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262(20): 9883-9886, 1987). Los datos sobre G71 coincidieron con la conclusión de que una mutación dio lugar a la desestabilización de la ATPasa vacuolar responsable de la acidificación endosomal. La desestabilización fue más evidente a temperaturas elevadas (39,5 °C), pero se expresó parcialmente incluso a temperaturas más bajas (34 °C). Un estudio del tráfico de dos enzimas lisosomales endógenas, la cathepsina D y la alfa-glucosidasa, en células G71 (Park *et al.*, *Somat. Cell Mol. Genet.* 17(2): 137-150, 1991) demostró que ambas enzimas se secretaron cuantitativamente a temperaturas elevadas, y la glicosilación de las enzimas no se vio afectada. La secreción de la alfa-glucosidasa ácida fosforilada fue significativamente superior a las temperaturas no permisivas.

La eficacia terapéutica de un preparado de enzima sulfatasa lisosomal no solo depende del nivel de manosa-6-fosfato, sino que también depende de la presencia de enzima activa en dicho preparado. Todas las sulfatasas conocidas contienen un resto de cisteína en su sitio catalítico; este resto de cisteína es modificado después de la traducción a C α -formilglicina (FGly) para activar la enzima. Esta activación de la enzima después de la traducción de cisteína en FGly, que es catalizada por el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1), se produce en el retículo endoplasmático en sulfatasas desplegadas inmediatamente después de la traducción, antes de la dirección de las sulfatasas al lisosoma (Dierks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94:11963-11968, 1997). La importancia de esta modificación posterior a la traducción única se pone de relieve por el hecho de que las mutaciones en SUMF1, que dan lugar a la formación de FGly insuficiente en las enzimas sulfatasas lisosomales, causan deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD) en el ser humano (Diez-Ruiz *et al.*, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 355-379, 2005).

Por lo tanto, la capacidad de las células G71, células CHO mutantes que son defectuosas en la acidificación endosomal, para expresar conjuntamente la enzima modificadora de sulfatasa (SUMF1) humana recombinante y una enzima sulfatasa lisosomal humana proporciona un mecanismo para la producción a gran escala de recombinante enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes altamente fosforiladas activas útiles para el tratamiento de trastornos por depósito lisosomal causados por o asociados con una deficiencia de dichas enzimas sulfatasas lisosomales.

I. DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en la presente invención: Singleton *et al.*, "DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY" (2ª ed. 1994); "THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY" (Walker ed., 1988); "THE GLOSSARY OF GENETICS", 5ª ED., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, "THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY" (1991).

Cabe señalar en el presente documento que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usan en el presente documento, los siguientes términos y expresiones tienen los significados que se les atribuyen a no ser que se especifique lo contrario.

- La expresión "variante alélica" se refiere a cualquiera de dos o más formas polimórficas de un gen que ocupan el mismo locus genético. Las variaciones alélicas se presentan naturalmente por mutación, y pueden dar lugar a polimorfismos fenotípicos dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (es decir, sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión "variantes alélicas" también se refiere a ADNc derivados de transcripciones de ARNm de variantes alélicas genéticas, así como de las proteínas codificadas por los mismos.
- El término "amplificación" se refiere a cualquier medio mediante el que se copia una secuencia polinucleótida, y por lo tanto, se la expande en un número más grande de moléculas polinucleótidas, por ejemplo, mediante transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la ligasa.
- Una primera secuencia es una "secuencia antisentido" con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia se hibrida específicamente con un polinucleótido cuya secuencia es la segunda secuencia.
- "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, en forma mono o bicatenaria.
- La anotación convencional se usa en el presente documento para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótido monocatenaria es el extremo 5'; el sentido hacia la izquierda de una secuencia de polinucleótido bicatenaria se refiere a la dirección 5'. El sentido de la adición de 5' a 3' de nucleótidos a productos de la transcripción de ARN nacientes se denomina la dirección de la transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que están situadas 5' con respecto al extremo 5' del producto de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las secuencias de la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están 3' con respecto al extremo 3' del producto de transcripción de ARN codificante se denominan "secuencias cadena abajo".
- El término "complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o al apareamiento entre sí de superficies interactivas de dos polinucleótidos. Así pues, las dos moléculas pueden describirse como complementarias, y además, las características de las superficies de contacto son complementarias entre sí. Un primer polinucleótido es complementario a un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido pareja de unión del segundo polinucleótido. Por lo tanto, el polinucleótido cuya secuencia 5'-TATAC-3' es complementaria a un polinucleótido cuya secuencia es 5'-GTATA-3'. Una secuencia de nucleótidos es "esencialmente complementaria" a una secuencia de nucleótidos de referencia si la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos en cuestión es esencialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia.
- La expresión "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución efectuada en un polipéptido de un aminoácido con un aminoácido funcionalmente similar. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:
- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
 - 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
 - 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
 - 4) Arginina (R), Lisina (K);
 - 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
 - 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).
- El término "fragmento", cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a polipéptidos que son más cortos que el polipéptido de longitud completa en virtud de truncamiento ya sea en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína o en ambos, y/o por la eliminación de una parte interna o la región de la proteína. Los fragmentos de un polipéptido se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica.
- El término "mutante", cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a polipéptidos en los que uno o más aminoácidos de la proteína se han sustituido con un aminoácido diferente. La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa, tal como se ha definido anteriormente, o puede ser una sustitución no conservativa. Los polipéptidos mutantes se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica.
- El término "derivado", cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas, por ejemplo y sin limitación, tales como la ubiquitinación, el marcaje (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), la unión del polímero covalente tal como la pegilación (es decir, la derivatización con polietilenglicol) y la inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no se producen en las proteínas humanas. Los polipéptidos derivados se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica.

El término "derivado", cuando se usa en referencia a las líneas celulares, se refiere a líneas celulares que son descendientes de la línea de células madre; por ejemplo, este término incluye células que han sido sometidas a pases o subclonadas a partir de células madre y que conservan la propiedad deseada, descendientes de la línea de células madre que se han mutado y seleccionado para la conservación de la propiedad deseada, y descendientes de la línea de células madre que se han modificado para contener diferentes vectores de expresión o diferentes ácidos nucleicos añadidos exógenamente.

El término "detección" se refiere a determinar la presencia, ausencia o cantidad de un analito en una muestra, y puede incluir la cuantificación de la cantidad del analito en una muestra o por célula en una muestra.

La expresión "fracción detectable" o el término "marcador" se refieren a una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como las que se usan comúnmente en un ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. La fracción detectable suele generar una señal medible, tal como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que se puede usar para cuantificar la cantidad de fracción detectable unida de una muestra. La fracción detectable se puede incorporar o unir a un cebador o una sonda bien de forma covalente, o a través de enlaces iónicos, van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, la incorporación de nucleótidos radiactivos, o nucleótidos biotinilados que son reconocidos por la estreptavidina. La fracción detectable puede ser directa o indirectamente detectable. La detección indirecta puede implicar la unión de una segunda fracción detectable directa o indirectamente a la fracción detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser el ligando de una pareja de unión, tal como biotina, que es una pareja de unión para la estreptavidina, o una secuencia de nucleótidos, que es la pareja de unión para una secuencia complementaria, a la que puede hibridarse específicamente. La pareja de unión puede ser en sí misma directamente detectable, por ejemplo, se puede marcar un anticuerpo con una molécula fluorescente. La pareja de unión también puede ser indirectamente detectable, por ejemplo, un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria puede ser parte de una molécula de ADN ramificada que, a su vez, es detectable a través de la hibridación con otras moléculas de ácidos nucleicos marcadas. (Véase, por ejemplo, Fahrlander *et al.*, *Bio/Technology* 6: 1165, 1988). La cuantificación de la señal se obtiene, por ejemplo, mediante recuento de centelleo, densitometría o citometría de flujo.

El término "diagnóstico" significa identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica. Los métodos de diagnóstico difieren en cuanto a su especificidad y selectividad. Si bien es posible que un método de diagnóstico particular no proporcione un diagnóstico definitivo de una afección, basta con que el método proporcione una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una dosis suficiente para producir un efecto deseado sobre un estado de salud, patología y enfermedad de un sujeto, o para fines de diagnóstico. El resultado deseado puede comprender una mejoría subjetiva u objetiva en el receptor de la dosis. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un agente que es eficaz para producir el efecto beneficioso deseado sobre la salud.

La expresión "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos de un polinucleótido, tales como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen ya sea una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Así pues, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm producido por ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos de la que es idéntica a la secuencia de ARNm se proporciona normalmente en listados de secuencias, y la cadena no codificante, usada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc se puede decir que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

La expresión "dosis equivalente" se refiere a una dosis que contiene la misma cantidad de agente activo.

La expresión "secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que regula la expresión (transcripción y/o traducción) de una secuencia de nucleótidos ligada operativamente a la misma. La expresión "ligada operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos partes en la que la actividad de una parte (por ejemplo, la capacidad de regular la transcripción) da lugar a una acción sobre la otra parte (por ejemplo, la transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de la expresión pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, secuencias de promotores (por ejemplo, inducibles o constitutivos), potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, un ATG), señales de corte y empalme para intrones y codones de detención.

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión ligadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que debe ser expresada. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción cis para la expresión; se pueden

suministrar otros elementos para la expresión por parte de la célula hospedadora o por el sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los que se conocen en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que llevan incorporados el polinucleótido recombinante.

5 Las expresiones "altamente fosforilada", "alto nivel de fosforilación" y "alto nivel de oligosacáridos fosforilados" se refieren a preparados de enzimas sulfatasas lisosomales en las que al menos el 50 % de la enzima sulfatasa lisosomal se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes a través de oligosacáridos fosforilados. La unión se caracteriza además por la sensibilidad a la competencia con manosa-6-fosfato. Una enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada también puede referirse a una enzima sulfatasa lisosomal con al menos 0,25, preferentemente al
10 menos 0,5 y más preferentemente al menos 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína.

La expresión "cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas", como se usa en el presente documento, se refiere a cadenas de oligosacáridos que contienen manosa de que están ligadas en N a restos de asparagina en las enzimas sulfatasas lisosomales y que comprenden dos restos de manosa-6-fosfato. Por lo general, las cadenas de oligomanosa bis-
15 fosforiladas tienen 7 restos de manosa, es decir, bis-fosfato manosa 7 (BPM7), que están enlazados a dos restos de GlcNAc, que, a su vez, están enlazados al resto de asparagina en la enzima sulfatasa lisosomal.

Los términos "activo/a" y "activado/a", y la expresión "alto nivel de activación" se refieren a preparados de enzimas sulfatasas lisosomales en los que al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 90 % e incluso más preferentemente al menos el 95 % del resto de cisteína del sitio activo de la proteína se ha modificado después de la traducción a C α -formilglicina (FGly).
20

La expresión "altamente fosforilada activa" se refiere a se refiere a preparados de enzimas sulfatasas lisosomales en los que al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 90 % e incluso más preferentemente al menos el 95 % de los restos de cisteína del sitio activo de la proteína se ha modificado después de la traducción a C α -formilglicina (FGly) y con al menos 0,25, preferentemente al menos 0,5 y más preferentemente al
25 menos 0,75 cadenas de oligomanosa bis-fosforiladas por cadena de proteína.

La expresión "biológicamente activo" se refiere a un polipéptido (es decir, enzima) fragmentos, mutantes, variantes o derivados del mismo que conservan al menos una cantidad sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 70 % y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %) de una o más actividades biológicas del polipéptido de longitud completa. Cuando se usa en referencia a una enzima sulfatasa lisosomal, un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma conserva al menos una cantidad sustancial de la actividad de sulfatasa (es decir, la escisión de ésteres de sulfato de sus sustratos diana).
30 Cuando se usa en referencia al factor de modificación 1 de sulfatasas(SUMF1), un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado del mismo conserva al menos una cantidad sustancial de actividad generadora de formilglicina (es decir, la modificación de un resto de cisteína del sitio activo de una enzima sulfatasa lisosomal a C α -formilglicina (FGly)).
35

El término "pureza" o "puro", cuando se usa en referencia a polipéptidos, se refiere a la cantidad del polipéptido que se está analizando en comparación con las sustancias contaminantes que se pueden detectar usando un método particular. Para las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes de la invención, la "pureza" se puede determinar sometiendo el preparado de enzima sulfatasa a la separación electroforética por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, seguido de la tinción con azul de Coomassie o plata, o por separación cromatográfica mediante HPLC (por ejemplo, fase inversa C4 (RP)) o por cualquier otra separación cromatográfica, por ejemplo, exclusión por tamaño (SEC) y similares. Usando estos métodos, las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes purificadas de la invención tienen una pureza de al menos aproximadamente el 80 %, preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % y aún más preferentemente al menos aproximadamente el 98 % o el 99 %.
40
45
50

El término "precursor" o la expresión "forma precursora" se refieren a la forma de la enzima sulfatasa lisosomal recombinante que se secreta a partir de una célula de mamífero, es decir, que carece de la secuencia señal, pero que carece de ciertas modificaciones, por ejemplo, la escisión interna de las proteínas, que normalmente se produce en el lisosoma. Los términos "maduro/a", "forma madura", "procesado/a" o "forma procesada" se refieren a la forma de la enzima sulfatasa lisosomal recombinante que normalmente existe en el lisosoma. Para las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes de la invención, la abundancia relativa de "precursor" o "forma precursora" y "madura", "forma madura", "procesada" o "forma procesada" se puede determinar sometiendo el preparado de la enzima sulfatasa a separación electroforética por SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de la tinción con azul de Coomassie o plata, o mediante la separación cromatográfica por HPLC (por ejemplo, fase inversa C4 (RP)) o mediante cualquier otra separación cromatográfica, por ejemplo, exclusión por tamaño (SEC) y similares. Usando estos métodos, las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes purificadas de la invención consisten en al menos aproximadamente un 75 %, preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % e incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de "precursor" o "forma precursora". Como alternativa, usando estos métodos, las enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes purificadas de la invención consisten en menos del aproximadamente 25 %, preferentemente menos del aproximadamente 15 %, más preferentemente menos del aproximadamente 10 % e incluso más preferentemente menos del aproximadamente 5 %
55
60
65

de "maduras", "forma madura", "procesada" o "forma procesada". En algunas realizaciones, solo se detecta el precursor o la "forma precursora" (es decir, el preparado de enzima sulfatasa consiste esencialmente en una sola banda detectable cuando se somete a SDS-PAGE en condiciones reductoras o un solo pico cuando se analiza mediante HPLC).

Las expresiones "idéntico/a" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o de restos de aminoácidos que son los mismos, cuando se los comparan y se alinean para obtener la máxima correspondencia, medida usando uno o más de los siguientes algoritmos para la comparación de secuencias o mediante examen visual.

El término "conector" se refiere a una molécula que se une a otras dos moléculas, bien covalentemente o mediante enlaces iónicos, de van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia complementaria en el extremo 5' y a otra secuencia complementaria en el extremo 3', uniendo así dos secuencias no complementarias.

Las expresiones "bajo nivel de fosforilación" o "baja fosforilación" se refieren a un preparado de enzimas sulfatasas lisosomales en el que la absorción en los fibroblastos tiene una concentración máxima media superior a 10 nM o la fracción de enzimas sulfatasas lisosomales que se une a la columna de receptor de manosa-6-fosfato es inferior al aproximadamente 25 %.

La expresión "de origen natural", como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para su uso farmacéutico en un sujeto animal, incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de una enzima sulfatasa lisosomal terapéutica y también comprende uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica engloba una composición que comprende el/los principio/s activo/s y el/los ingrediente/s inerte/s que componen el vehículo, diluyente o excipiente, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención engloban cualquier composición preparada mezclando una enzima sulfatasa lisosomal de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La expresión "vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los vehículos, diluyentes, tampones y excipientes farmacéuticos convencionales, tales como, por ejemplo y sin limitación, una solución salina tamponada con fosfato, solución acuosa al 5 % de dextrosa y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o una emulsión de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Los vehículos adecuados, diluyentes o excipientes farmacéuticos adecuados y las formulaciones se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences", 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticos preferidos dependen del modo pretendido de administración del agente activo. Los modos típicos de administración incluyen, por ejemplo, y sin limitación, la inyección enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal); o la administración tópica, transdérmica o transmucosal.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que puede formularse en una enzima sulfatasa lisosomal para uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales de metales (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

El término "polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto de unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, tales como ácido desoxirribonucleico ("ADN") y ácido ribonucleico ("ARN"), así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos que incluyen bases no naturales, nucleótidos que participan en enlaces con otros nucleótidos distintos del enlace de fosfodiéster natural o que incluyen bases unidas a través de enlaces distintos de los enlaces de fosfodiéster. Así pues, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. La expresión "ácido nucleico" normalmente se refiere a polinucleótidos grandes. El término "oligonucleótido" normalmente se refiere a polinucleótidos cortos, en general, no superiores a aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" sustituye a "T."

El término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de restos de aminoácidos, variantes estructurales naturales relacionadas y análogos de origen no natural sintéticos de los mismos unidos a través de enlaces peptídicos, variantes estructurales naturales relacionadas y análogos de origen no natural sintéticos de los mismos. Los polipéptidos

sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. El término "proteína" normalmente se refiere a polipéptidos grandes. El término "péptido" se refiere normalmente a polipéptidos cortos. La notación convencional se usa en el presente documento para retratar secuencias polipeptídicas: el extremo izquierdo de una secuencia polipeptídica es el extremo amino terminal; el extremo derecho de una secuencia polipeptídica es el extremo carboxilo terminal.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a un molde de polinucleótido designado y proporcionar un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Dicha síntesis se produce cuando el cebador de polinucleótido se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, un molde polinucleotídico complementario, y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa. Un cebador es normalmente monocatenario, pero puede ser bicatenario. Los cebadores son normalmente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia variedad de cebadores sintéticos y de origen natural son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario al molde para el que está diseñado para hibridarse para servir como un sitio para el inicio de la síntesis, pero no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. En dicho caso, la hibridación específica del cebador al molde depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse con, por ejemplo, fracciones cromogénicas, radiactivas o fluorescentes, y usarse como fracciones detectables.

El término "sonda", cuando se usa en referencia a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a una secuencia designada de otro polinucleótido. Una sonda se hibrida específicamente con un polinucleótido complementario diana, pero no necesita reflejar la secuencia complementaria exacta del molde. En dicho caso, la hibridación específica de la sonda a la diana depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse con, por ejemplo, fracciones cromogénicas, radiactivas o fluorescentes, y usarse como fracciones detectables.

Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o que solo muestra signos tempranos con el fin de reducir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos de la invención se pueden administrar como un tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología o para reducir al mínimo la gravedad de la patología, si se desarrolla.

La expresión "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas de manera natural entre sí. Se puede incluir un polinucleótido recombinante amplificado en un vector adecuado, y el vector puede usarse para transformar una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". El gen se expresa entonces en la célula hospedadora recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante puede servir para una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión de ribosomas, etc.) también.

Las expresiones "hibridarse específicamente con", "hibridación específica" o "hibridarse selectivamente a" se refieren a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en un ADN o ARN de mezcla compleja (por ejemplo, celular total).

La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente con su subsecuencia diana, y en menor medida con, o nada en absoluto con, otras secuencias. "Hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosa" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones de Southern y Northern son dependientes de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. En Tijssen (1993) "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology"--Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York, se encuentra una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos. En general, la hibridación altamente rigurosa y las condiciones de lavado se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C menos que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T_m para una determinada sonda.

Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro de una transferencia de Southern o Northern es formalina al 50 % con 1 mg de heparina a 42 °C, llevándose a cabo la hibridación durante una noche. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de SSC x 0,2 a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook *et al.* para una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado de alta rigurosidad está precedido por un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de astringencia media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1 x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es x 4-6 SSC a 40 °C durante 15 minutos. En general, una relación de señal a ruido del doble (o superior) de la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica

la detección de una hibridación específica.

Un "sujeto" de diagnóstico o tratamiento es un ser humano o un animal, incluyendo un mamífero o un primate.

5 La expresión "esencialmente homólogos" o "esencialmente idénticos" en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere, en general, a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos un 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de restos de nucleótidos o de aminoácidos, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante examen visual. Preferentemente, existe una identidad sustancial sobre una región de las
10 secuencias que es al menos de aproximadamente 50 restos de longitud, más preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 100 restos y lo más preferentemente las secuencias son esencialmente idénticas sobre al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son esencialmente idénticas sobre toda la longitud de uno o ambos biopolímeros de comparación.

15 Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencias para la/s secuencia/s de ensayo con respecto a la secuencia
20 de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Match.* 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos
25 (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante examen visual.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de
30 secuencias relacionadas usando alineamientos por pares, progresivos, para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También representa un árbol o dendograma que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360, 1987. El método usado es similar al método descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153, 1989. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o
35 aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento por pares de las dos secuencias más similares, produciendo una agrupación de dos secuencias alineadas. Esta agrupación se alinea con la siguiente secuencia más relacionada o agrupación de secuencias alineadas. Dos agrupaciones de secuencias se alinean mediante una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineamientos por pares, progresivos. El programa se ejecuta diseñando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácido o nucleótido de las regiones de comparación de secuencias y designando
40 los parámetros del programa. Por ejemplo, se puede comparar una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de relación de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos terminales ponderados. Otro algoritmo que es útil para generar múltiples alineaciones de secuencias es Clustal W (Thompson *et al.*, *Nucleic Acids Research*
45 22: 4673-4680, 1994).

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.
50 Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que bien coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990). Estos aciertos de la palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar los HSP más largos que los contienen. Los
55 aciertos de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia mediante lo que se puede aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada
60 dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más de las alineaciones de restos puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una
65 comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y

Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU.* 89: 10915, 1989).

Además de calcular el porcentaje de la identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU.* 90: 5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que se produciría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son esencialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Así pues, un polipéptido normalmente es esencialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos solo difieren en sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son esencialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe en el presente documento.

La expresión "esencialmente puro/a" o el término "aislado/a" significan que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar, más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual presente en la composición) y una fracción esencialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende por lo menos aproximadamente el 50 % (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición esencialmente pura significa que aproximadamente del 80 % al 90 % o más de la especie macromolecular presente en la composición es la especie purificada de interés. La especie objeto es purificada hasta su homogeneidad esencial (no es posible detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) si la composición consiste esencialmente en especies macromoleculares individuales. Las especies solventes, las moléculas pequeñas (< 500 Daltons), los agentes estabilizantes (por ejemplo, BSA) y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares para los fines de la presente definición. En algunas realizaciones, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención están esencialmente puras o aisladas con respecto a los materiales de partida macromoleculares usados en su síntesis. En alguna realización, la composición farmacéutica de la invención comprende una enzima sulfatasa lisosomal terapéutica esencialmente purificada o aislada mezclada con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas de patología a los efectos de reducir o eliminar estos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención pueden administrarse como un tratamiento terapéutico o de diagnóstico.

La expresión "índice terapéutico" se refiere a un intervalo de dosis (cantidad y/o momento) por encima de la cantidad terapéutica mínima y por debajo de una cantidad inaceptablemente tóxica.

"Tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico o a tratamiento terapéutico o a tratamiento de diagnóstico.

La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de enzima sulfatasa lisosomal de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen de la enzima sulfatasa lisosomal empleada en particular y del efecto por conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada enzima sulfatasa lisosomal en el hospedador.

II. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS SULFATASAS LISOSOMALES

En el presente documento, se muestra un nuevo método de producción de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas en cantidades que permiten el uso terapéutico de dichas enzimas. En general, el método incluye la transformación de una línea celular adecuada con el ADNc codificante del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado del mismo y un ADNc codificante de la enzima sulfatasa lisosomal de longitud completa o un fragmento biológicamente activo, mutante, variante o derivado de la misma. Los expertos en la materia pueden preparar construcciones de expresión distintas de las que se describen expresamente en el presente documento para la producción óptima de dichas enzimas sulfatasas lisosomales en líneas celulares transfectadas adecuadas. Por otra parte, los expertos en la materia pueden diseñar fácilmente fragmentos de ADNc codificante de fragmentos biológicamente activos, variantes, mutantes o derivados del SUMF1 o de las enzimas sulfatasas lisosomales de origen natural que poseen una actividad biológica igual o similar a la de las enzimas de longitud completa de origen natural.

Células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes son líneas celulares de acidificación endosomal deficiente que se caracterizan por su capacidad para producir dichas enzimas sulfatasas lisosomales en cantidades que permitan el uso de la enzima terapéuticamente. La divulgación proporciona una línea celular de grupo de complementación END3, derivada de CHO-K1, designada G71. La divulgación también proporciona una línea celular G71 que se ha adaptado para el crecimiento en cultivo en suspensión exento de suero, designada G71S. La divulgación también proporciona derivados de las líneas celulares G71 y G71S que se han subclonado más o que contienen diferentes plásmidos de expresión.

Las células que contienen y expresan ADN o ARN que codifica una proteína recombinante se denominan en el presente documento células genéticamente modificadas. Las células de mamífero que contienen y expresan ADN o ARN codificante de la proteína recombinante se denominan células de mamífero genéticamente modificadas. La introducción del ADN o ARN en las células es mediante un método de transfección conocido, tal como, por ejemplo y sin limitación, electroporación, microinyección, bombardeo de microproyectiles, precipitación con fosfato de calcio, precipitación con fosfato de calcio modificado, tratamiento con lípidos catiónicos, fotoporación, metodologías de fusión, transferencia mediada por receptor o precipitación con polibreno. Como alternativa, el ADN o ARN se pueden introducir mediante la infección con un vector vírico. Los métodos de producción de células, incluyendo células de mamífero, que expresan ADN o ARN codificante de una proteína recombinante se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. en trámite junto con la presente con n.º de serie 08/334.797, titulada "In Vivo Protein Production and Delivery System for Gene Therapy", de Richard F. Selden, Douglas A. Treco y Michael W. Heartlein (presentada el 4 de noviembre de 1994); documento de EE.UU. con n.º de serie 08/334.455, titulado "In Vivo Production and Delivery of Erythropoietin or Insulinotropin for Gene Therapy", de Richard F. Selden, Douglas A. Treco y Michael W. Heartlein (presentado el 4 de noviembre de 1994) y documento de EE.UU. con n.º de serie 08/231.439, titulado "Targeted Introduction of DNA Into Primary or Secondary Cells and Their Use for Gene Therapy", de Douglas A. Treco, Michael W. Heartlein y Richard F. Selden (presentado el 20 de abril de 1994).

En realizaciones preferidas, la célula hospedadora usada para producir enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes es una línea celular deficiente en la acidificación endosomal que se caracteriza por su capacidad para producir dichas enzimas sulfatasas lisosomales en cantidades que permiten el uso de la enzima terapéuticamente. En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una línea celular de grupo de complementación END3, derivada de CHO-K1, designada G71, y una línea celular G71 que se ha adaptado al crecimiento en cultivo en suspensión exento de suero, designada G71S, que expresan conjuntamente el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano y una enzima sulfatasa lisosomal recombinante, y por tanto, son capaces de producir altos rendimientos de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas, según lo especificado en el apartado de "Definiciones", lo que permite la producción a gran escala de enzimas sulfatasas lisosomales terapéuticas. En las realizaciones más preferidas, la línea celular G71 o G71S, o el derivado de la misma, expresa y secreta enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes en cantidades de al menos aproximadamente 0,5, preferentemente al menos aproximadamente 0,75, más preferentemente al menos aproximadamente 1,0 e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 1,25 picogramos/célula/día.

Vectores y construcciones de ácidos nucleicos

Una construcción de ácido nucleico usada para expresar la proteína recombinante, ya sea el factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano o la enzima sulfatasa lisosomal o ambos, puede ser aquel que se exprese extracromosómicamente (episomalmente) en la célula de mamífero transfectada o aquel que se integre, ya sea aleatoriamente o en un sitio diana previamente seleccionado a través de la recombinación homóloga, en el genoma de la célula receptora. Una construcción que se expresa comprende extracromosómicamente, además de las secuencias que codifican proteínas recombinantes, las secuencias suficientes para la expresión de la proteína en las células y, opcionalmente, para la replicación de la construcción. Por lo general, incluye un promotor, ADN que codifica la proteína recombinante y un sitio de poliadenilación. El ADN que codifica la proteína recombinante se coloca en la construcción de manera que su expresión esté bajo el control del promotor. Opcionalmente, la construcción puede contener componentes adicionales tales como uno o más de los siguientes: un sitio de corte y empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor apropiado, un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor apropiado y una región de unión a la matriz (MAR) u otro elemento conocido en la técnica que potencie la expresión de la región en la que se inserta.

En aquellas realizaciones en las que la construcción de ADN se integra en el genoma de la célula, solo es necesario incluir las secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas recombinantes. Opcionalmente, se puede incluir un promotor y una secuencia potenciadora, uno o varios sitios de poliadenilación, uno o varios sitios de corte y empalme, secuencias de ácido nucleico que codifican uno o varios marcadores seleccionables, secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador amplificable, una región de unión a la matriz (MAR) u otro elemento conocido en la técnica que potencie la expresión de la región en la que se inserta, y/o ADN homólogo al ADN genómico en la célula receptora, para dirigir la integración del ADN en un sitio seleccionado en el genoma (con el ADN diana o secuencias de ADN).

Métodos de cultivo celular

Las células de mamífero que contienen el ADN o ARN que codifica la proteína recombinante se cultivan en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células y la expresión del ADN o ARN. Aquellas células que expresan la proteína recombinante se pueden identificar, usando métodos y procedimientos conocidos descritos en el presente documento, y la proteína recombinante se puede aislar y purificar, usando métodos y procedimientos conocidos también descritos en el presente documento, ya sea con o sin amplificación de la producción de proteína recombinante. La identificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, a través de detección de células de mamífero modificadas genéticamente que muestran un fenotipo indicativo de la presencia de ADN o ARN codificante de la proteína recombinante, tal como la detección mediante PCR, la detección mediante análisis de transferencia de Southern o la detección de la expresión de la proteína recombinante. La selección de células que contienen ADN codificante de la proteína recombinante incorporado puede realizarse mediante la inclusión de un marcador seleccionable en la construcción de ADN, con el subsiguiente cultivo de las células transfectadas o infectadas que contienen un gen marcador seleccionable, en condiciones apropiadas para la supervivencia de solo aquellas células que expresen el gen marcador seleccionable. Además, la amplificación de la construcción de ADN introducida se puede efectuar mediante el cultivo de células de mamíferos modificadas genéticamente en condiciones apropiadas (por ejemplo, el cultivo de células de mamífero modificadas genéticamente que contienen un gen marcador amplificable en presencia de una concentración de un fármaco a la que solo pueden sobrevivir las células que contienen múltiples copias del gen marcador amplificable).

Las células de mamífero modificadas genéticamente que expresan la proteína recombinante se pueden identificar, como se describe en el presente documento, mediante la detección del producto de expresión. Por ejemplo, las células de mamífero que expresan enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas se pueden identificar mediante un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich. Los anticuerpos se pueden dirigir hacia la parte de agente activo.

Variantes de enzimas sulfatasas lisosomales

En ciertas realizaciones, se pueden preparar mutantes o variantes de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas, y serán útiles en una variedad de aplicaciones en las que se pueden usar enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas. Los mutantes o las variantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido pueden ser, mutantes o variantes por sustitución, inserción o eliminación. Los mutantes o variantes por eliminación carecen de uno o más restos de la proteína nativa que no son esenciales para la función o la actividad inmunogénica. Un tipo común de mutante o variante por eliminación es aquel que carece de secuencias de señales secretoras o secuencias señal que dirigen a una proteína a unirse a una determinada parte de una célula. Los mutantes o variantes por inserción normalmente implican la adición de material en un punto no terminal del polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunoreactivo o simplemente un único resto. Las adiciones terminales, también denominadas proteínas de fusión, se describen a continuación.

Las variantes pueden ser esencialmente homólogas o esencialmente idénticas a la enzima sulfatasa lisosomal no modificada según lo establecido anteriormente. Las variantes preferidas son aquellas que son variantes de un polipéptido enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa que conserva al menos algo de la actividad biológica, por ejemplo, la actividad sulfatasa, de la enzima sulfatasa lisosomal. Otras variantes preferidas incluyen variantes de un polipéptido N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humano que conservan al menos algo de la actividad de sulfatasa de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana.

Las mutantes o variantes por sustitución normalmente tienen intercambiado un aminoácido del polipéptido de tipo silvestre por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del polipéptido tales como, por ejemplo y sin limitación, la estabilidad frente a la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de este tipo son preferentemente conservativas, es decir, un aminoácido se sustituye con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservativas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

Un aspecto de la presente divulgación contempla la generación de mutantes o variantes del sitio de glicosilación en las que se ha mutado el sitio de glicosilación ligado a N o a O de la enzima sulfatasa lisosomal. Dichos mutantes o variantes aportarán importante información relativa a la actividad biológica, la estructura física y el potencial de unión al sustrato de la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa. En aspectos particulares, se contempla que es posible generar otros mutantes o variantes del polipéptido enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa que conserven la actividad biológica, pero que tengan actividad de unión al sustrato aumentada o reducida. Como tales, las mutaciones del sitio activo o de la región catalítica se contemplan particularmente con el fin de generar mutantes o variantes de proteínas con la actividad de unión al sustrato modificada. En dichas realizaciones, se comparó la secuencia de la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa con la de las otras enzimas relacionadas, mutándose específicamente restos seleccionados.

Numerando los aminoácidos de la proteína madura desde el extremo amino terminal putativo como aminoácido número 1, las mutaciones ilustrativas que pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, la sustitución de todas o algunas asparaginas

potencialmente glicosiladas, incluyendo las posiciones 178 y 397 de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante (véase la Figura 5).

5 La unión al sustrato se puede modificar mediante mutaciones en/cerca del sitio activo de la enzima sulfatasa lisosomal. Teniendo en cuenta que dichas mutaciones son ilustrativas, los expertos en la materia reconocerán que se pueden realizar otras mutaciones de la secuencia de la enzima para proporcionar información estructural y funcional adicional sobre esta proteína y su actividad.

10 Para construir mutantes o variantes tales como las descritas anteriormente, un experto en la materia puede emplear tecnologías convencionales bien conocidas. En concreto, se contemplan las eliminaciones N-terminales, eliminaciones C-terminales, eliminaciones internas, así como la mutagénesis al azar y puntual.

15 Las eliminaciones N-terminales y C-terminales son formas de mutagénesis de eliminación que se aprovechan, por ejemplo, de la presencia de un sitio de restricción único adecuado cerca de la región C- o N-terminal. El ADN se escinde en el sitio y los extremos cortados son degradados mediante nucleasas tales como BAL31, exonucleasa III, DNasa I y nucleasa S1. La reunión de los dos extremos produce una serie de ADN con eliminaciones de tamaño variable alrededor del sitio de restricción. Las proteínas expresadas a partir de dicho mutante se pueden ensayar para determinar la función biológica apropiada, por ejemplo, la actividad enzimática, usando técnicas convencionales en la materia, y descritas en la memoria descriptiva. Se pueden emplear técnicas similares para los mutantes de eliminación
20 internos mediante el uso de dos sitios de restricción convenientemente colocados, permitiendo de esta manera que se pueda realizar una eliminación definida con precisión, y los extremos se vuelven a ligar como antes.

25 También se contemplan mutantes de digestión parcial. En dichos casos, un experto en la materia emplearía un "cortador frecuente" que corte el ADN en numerosos lugares en función de la duración de la reacción. Por lo tanto, mediante la variación de las condiciones de reacción será posible generar una serie de mutantes de tamaño variable, que se puedan examinar después para determinar la actividad.

30 También se puede realizar una mutación por inserción al azar mediante el corte de la secuencia de ADN con una DNasa I, por ejemplo, y la inserción de un tramo de nucleótidos codificante de 3, 6, 9, 12, etc., aminoácidos y la religación del extremo. Una vez realizada dicha mutación, se pueden explorar los mutantes para detectar diversas actividades presentadas por la proteína de tipo silvestre.

35 La mutagénesis puntual también se puede emplear para identificar, en particular, qué restos de aminoácidos son importantes en determinadas actividades asociadas a la actividad biológica de la enzima sulfatasa lisosomal. Por lo tanto, un experto en la materia será capaz de generar cambios de una sola base de la cadena de ADN para dar lugar a un codón modificado y a una mutación de sentido erróneo.

40 Los aminoácidos de una determinada proteína se pueden modificar para crear una molécula equivalente, o incluso mejorada, de segunda generación. Dichas alteraciones contemplan la sustitución de un aminoácido dado de la proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos o sitios de unión a moléculas de sustrato o receptores. Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtenerse una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se pueden realizar varios cambios en las
45 secuencias de ADN de genes sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, como se describe más adelante.

50 Al hacer dichos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que, a su vez, define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. Cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga (Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982). En general, los aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tengan un índice o valor hidropático similar y que sigan generando una proteína con actividad biológica similar, es decir, que todavía se obtenga una proteína funcionalmente biológica.

55 Además, se puede realizar la sustitución de aminoácidos similares eficazmente basándose en la hidrofiliidad. La patente de EE.UU. n.º 4.554.101 afirma que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, que se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como tal, se puede sustituir un aminoácido con otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar, y seguir obteniéndose una proteína biológicamente
60 equivalente e inmunológicamente equivalente.

65 Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas que pueden usarse en el presente contexto de la invención incluyen, pero sin limitación, el intercambio de arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Otras de dichas sustituciones que tienen en cuenta la necesidad de la conservación de parte o la totalidad de la actividad biológica, mientras se modifica la estructura secundaria de la proteína serán bien conocidas por los expertos en la materia.

Otro tipo de variante que se contempla para la preparación de los polipéptidos de acuerdo con la invención es el uso de miméticos de péptidos. Los miméticos son moléculas que contienen péptidos que imitan a los elementos de la estructura secundaria de las proteínas. Véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, "Peptide Turn Mimetics" en BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto *et al.*, Eds., Chapman y Hall, Nueva York (1993). La razón que subyace al uso de miméticos de péptidos es que la cadena principal peptídica de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de aminoácidos con el fin de facilitar las interacciones moleculares, tales como las de anticuerpo y antígeno. Se espera que un mimético de péptido permita interacciones moleculares similares a la molécula natural. Estos principios pueden usarse, junto con los principios descritos anteriormente, para diseñar moléculas de segunda generación que tengan muchas de las propiedades naturales de las enzimas sulfatasas lisosomales, pero con características modificadas e incluso mejoradas.

Glicosilación modificada de enzimas sulfatasas lisosomales

También se pueden producir variantes de una enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa que tengan un patrón de glicosilación modificado en relación con el polipéptido precursor, por ejemplo, eliminando una o más fracciones de hidratos de carbono, y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido nativo.

La glicosilación normalmente está ligada a N o a O. la expresión "ligada a N" se refiere a la unión de la fracción de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido a excepción de prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. Por lo tanto, se pueden añadir sitios de glicosilación ligada a N a un polipéptido mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de estas secuencias tripeptídicas. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina. Los sitios de glicosilación ligada a O se pueden añadir mediante la inserción o sustitución de uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido inicial.

Conmutación de dominios

Diversas partes de proteínas de enzima sulfatasa lisosomal poseen una gran cantidad de homología de secuencia. Las mutaciones se pueden identificar en polipéptidos de enzimas sulfatasas lisosomales que pueden alterar su función. Estos estudios son potencialmente importantes al menos por dos razones. En primer lugar, proporcionan una expectativa razonable de que todavía pueden existir otros homólogos, variantes alélicas y mutantes de este gen en especies relacionadas, tales como rata, conejo, mono, gibón, chimpancé, mono, babuino, vaca, cerdo, caballo, oveja y gato. Tras el aislamiento de estos homólogos, variantes y mutantes, y en combinación con otros análisis, se pueden identificar ciertos dominios activos o funcionales. En segundo lugar, esto proporcionará un punto de partida para el posterior análisis mutacional de la molécula como se ha descrito anteriormente. Una forma de aprovechar esta información está en la "conmutación de dominios"

La conmutación de dominios implica la generación de moléculas recombinantes usando polipéptidos diferentes pero relacionados. Por ejemplo, mediante la comparación de la secuencia de una enzima sulfatasa lisosomal, por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, con la de una enzima sulfatasa lisosomal similar a partir de otra fuente y con mutantes y variantes alélicas de estos polipéptidos, se pueden hacer predicciones en cuanto a las regiones funcionalmente significativas de estas moléculas. Es posible, entonces, cambiar dominios relacionados de estas moléculas en un esfuerzo para determinar la criticidad de estas regiones para la función y los efectos de la enzima en los trastornos por depósito lisosomal. Estas moléculas pueden tener el valor adicional de que estas "quimeras" se pueden distinguir de las moléculas naturales, mientras que, posiblemente, proporcionan la misma o incluso una mejor función.

Basándose en las numerosas enzimas sulfatasas lisosomales que se están identificando ahora, se añadirá un nuevo análisis de las mutaciones y de sus efectos previstos sobre la estructura secundaria a esta comprensión. Se contempla que los mutantes que cambian dominios entre las enzimas sulfatasas lisosomales proporcionarán información útil sobre las relaciones de estructura/función de estas moléculas y los polipéptidos con los que interactúan.

Proteínas de fusión

Además de las mutaciones descritas anteriormente, la presente invención contempla además la generación de un tipo especializado de la variante de inserción conocida como una proteína de fusión. Esta molécula generalmente tiene toda o una parte sustancial de la molécula nativa, unida por el extremo N- o C-terminal, a la totalidad o una parte de un segundo polipéptido. Por ejemplo, las fusiones normalmente emplean secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un hospedador heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. La inclusión de un sitio de escisión en o cerca de la unión de fusión facilitará la eliminación del polipéptido foráneo después

de la purificación. Otras fusiones útiles incluyen la unión de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales de dirección celular o regiones transmembrana.

Existen varios sistemas de expresión de proteínas de fusión disponibles en el mercado que se pueden usar en la presente invención. Los sistemas particularmente útiles incluyen, pero sin limitación, el sistema de glutatión S-transferasa (GST) (Pharmacia, Piscataway, NJ), el sistema de proteínas de unión a maltosa (NEB, Beverley, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT), el sistema 6xHis (Qiagen, Chatsworth, CA). Estos sistemas son capaces de producir polipéptidos recombinantes portadores de solo un pequeño número de aminoácidos adicionales, que, con poca probabilidad, afectarán a la capacidad antigénica del polipéptido recombinante. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis añaden solo secuencias cortas, ambos de los cuales se sabe que son pobremente antigénicos y que no afectan adversamente al plegamiento del polipéptido a su conformación nativa. Otra fusión N-terminal que se contempla que es útil es la fusión de un dipéptido Met-Lys en la región N-terminal de la proteína o péptidos. Dicha fusión puede producir aumentos beneficiosos en la expresión o la actividad de la proteína.

Una construcción de fusión particularmente útil puede ser aquella en la que un polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa o un fragmento de la misma se fusiona a un hapteno para potenciar la inmunogenicidad de una construcción de fusión de enzima sulfatasa lisosomal. Esto puede ser útil en la producción de anticuerpos contra la enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa para permitir la detección de la proteína. En otras realizaciones, se puede realizar una construcción de fusión que mejorará la dirección de las composiciones relacionadas con la enzima sulfatasa lisosomal a un sitio específico o una célula específica.

Otras construcciones de fusión que incluyen un péptido heterólogo con las propiedades deseadas, por ejemplo, un motivo para dirigir la enzima sulfatasa lisosomal a un determinado órgano, tejido o tipo de célula. En una realización preferida, una construcción de fusión que incluye un péptido de dirección al hueso, por ejemplo, 6 restos de ácido aspártico (6xAsp o 6d) fusionados a una enzima sulfatasa lisosomal puede dirigir la enzima a determinados sitios en el hueso.

También se contemplan otras construcciones de fusión que incluyen un polipéptido heterólogo con las propiedades deseadas, por ejemplo, una región constante de Ig para prolongar la semivida en suero, o un anticuerpo o fragmento del mismo para la dirección. Otros sistemas de fusión producen híbridos de polipéptido en los que es deseable escindir la pareja de fusión del polipéptido deseado. En una realización, la pareja de fusión está enlazada al polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa recombinante mediante una secuencia de péptido que contiene una secuencia de reconocimiento específico para una proteasa. Los ejemplos de secuencias adecuadas son las reconocidas por la proteasa del virus del grabado del tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o el Factor Xa (New England Biolabs, Beverley, MA).

Derivados

Como se ha indicado anteriormente, un derivado se refiere a polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas tales como, por ejemplo y sin limitación, ubiquitinación, marcaje (por ejemplo, con radionucleidos o diversas enzimas), unión covalente de polímeros tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina. Los derivados de la enzima sulfatasa lisosomal también son útiles como agentes terapéuticos y se pueden producir mediante los métodos de la invención.

Se puede unir polietilenglicol (PEG) a la enzima sulfatasa lisosomal producida mediante los métodos de la invención para proporcionar una semivida más larga *in vivo*. El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente, y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG variará preferentemente de aproximadamente 2 kilodaltons ("kDa") a aproximadamente 100 kDa, más preferentemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, lo más preferentemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa. En general, los grupos PEG se unirán a las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo sobre la fracción de PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) a un grupo reactivo en la fracción de la proteína (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster). La adición de fracciones de PEG a polipéptidos de interés se puede llevar a cabo usando técnicas bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 96/11953 y la patente de EE.UU. n.º 4.179.337.

La unión del polipéptido de enzima sulfatasa lisosomal con PEG normalmente tiene lugar en fase acuosa, y se puede controlar fácilmente mediante HPLC analítica de fase inversa. Los péptidos PEGilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de desorción láser.

Marcadores

En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal terapéutica está marcada para facilitar su detección. Un "marcador" o una "fracción detectable" es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, marcadores radiactivos (por ejemplo, ³²P), fluoróforos (por ejemplo,

fluoresceína), reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, las comúnmente usadas en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos, así como proteínas que se pueden hacer detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de un radiomarcador en el hapteno o péptido, o se usan para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o péptido.

Los ejemplos de marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal, vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado de la enzima sulfatasa lisosomal de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el marcador, en una realización, se une covalentemente a la enzima sulfatasa lisosomal usando un reactivo de isocianato para la conjugación de un agente activo de acuerdo con la invención. En un aspecto de la invención, los reactivos de isocianato bifuncionales se pueden usar para conjugar un marcador a una enzima sulfatasa lisosomal para formar un conjugado de enzima sulfatasa lisosomal y marcador sin un agente activo unido al mismo. El conjugado de enzima sulfatasa lisosomal y marcador se puede usar como un producto intermedio para la síntesis de un conjugado marcado de acuerdo con la invención o se puede usar para detectar el conjugado de enzima sulfatasa lisosomal. Como se ha indicado anteriormente, se puede usar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el componente deseado de la enzima sulfatasa lisosomal, requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las disposiciones de eliminación. Los marcadores no radiactivos se suelen unir mediante medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la enzima sulfatasa lisosomal. El ligando se une a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), que bien es inherentemente detectable o se une covalentemente a un sistema señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención también se pueden conjugar directamente con compuestos generadores de señal, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas adecuadas para su uso como marcadores incluyen, pero sin limitación, hidrolasas, en particular, fosfatasas, esterasas y glicosidasas u oxidotasas, en particular, peroxidasas. Los compuestos fluorescentes, es decir, los fluoróforos, adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero sin limitación, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Otros ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero sin limitación, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, acridina amarilla, rodamina lisamina, eritrosceína de cloruro de sulfonilo B, rutenio (tris, bipyridinio), rojo Texas, dinucleótido nicotinamida adenina, dinucleótido flavina adenina, etc. Los compuestos quimioluminiscentes adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero sin limitación, luciferina y 2,3-dihidroxitalazinaodionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas de marcaje o productores de señal que se pueden usar en los métodos de la presente invención, véase la patente de EE.UU. n.º 4.391.904.

Los medios para la detección de marcadores son bien conocidos por los expertos en la materia. Así pues, por ejemplo, cuando el marcador es radiactivo, los medios de detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica, como en la autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Otros sistemas de marcaje y detección adecuados para su uso en los métodos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Dichos moduladores y ligandos marcados se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o afección.

En una realización preferida, el método comprende la etapa de producir enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas a partir de líneas celulares con defectos en el tráfico endosomal. En una realización particularmente preferida, el método comprende la etapa de producir N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa a partir de la línea celular de CHO G71, o un derivado de la misma. La producción de enzimas sulfatasas lisosomales tales como, por ejemplo y sin limitación, GALNS, comprende las etapas de: (a) desarrollar una línea celular G71 o derivada de G71 que exprese conjuntamente una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) y factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano recombinante; (b) cultivar líneas celulares que expresen conjuntamente la enzima sulfatasa lisosomal humana y el SUMF1; y (c) aumentar a escala las líneas celulares que expresen conjuntamente la enzima sulfatasa lisosomal humana y el SUMF1 para un biorreactor para la producción de enzimas sulfatasas lisosomales. En realizaciones preferidas, se subclonan los ADNc de enzima sulfatasa lisosomal humana, por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), y de SUMF1 humano en vectores de expresión de mamíferos, básicamente, como se describe en el presente documento a continuación.

Para el desarrollo de la línea celular, G71 o G71S, se cotransfectó un clon de G71 adaptado al crecimiento en cultivo en

suspensión exento de suero, con un vector de expresión de mamífero de GALNS humana, un vector de expresión de mamífero de SUMF1 humano y un gen marcador seleccionable, y se seleccionaron los transformantes estables. Tras una primera serie de subclonación de los transfectantes estables, se seleccionaron líneas celulares usando el sustrato fluorescente y se designaron específicamente. Se analizaron las líneas celulares de G71 o G71S para determinar la productividad específica de la célula (pg de producto/célula) en agitadores con microvehículos o en cultivo en suspensión, respectivamente. Se identificaron los mejores productores de GALNS humana y se ampliaron a escala para el biorreactor para la producción de material preclínico.

En el presente documento, también se desvela un ensayo basado en células para medir la actividad de una enzima lisosomal humana recombinante para degradar sustratos naturales. El método comprende (a) cultivar una célula humana aislada deficiente en la enzima lisosomal en condiciones en las que se acumulan los sustratos naturales para la enzima lisosomal; (b) poner en contacto la célula con la enzima lisosomal; (c) lisar la célula; (d) añadir el lisado celular a una enzima que (i) es específica de los sustratos naturales e (ii) escinde pequeños oligosacáridos de los sustratos naturales; (e) marcar los pequeños oligosacáridos con una fracción detectable; (f) opcionalmente, separar los oligosacáridos marcados pequeños; (g) detectar los oligosacáridos pequeños marcados; y (h) determinar la actividad de la enzima lisosomal para degradar los sustratos naturales mediante la comparación de (i) la cantidad de oligosacárido pequeño marcado de las células en contacto con la enzima lisosomal con (ii) la cantidad de oligosacáridos pequeños marcados de las células que no están en contacto con la enzima lisosomal, de modo que una reducción en (h) (i) en comparación con (h) (ii) indica que la actividad de la enzima lisosomal degrada los sustratos naturales. El oligosacárido pequeño puede ser un mono-, di, o tri-sacárido. El oligosacárido pequeño puede ser un disacárido.

En algunas realizaciones, la enzima lisosomal se selecciona del grupo que consiste en arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS). La enzima lisosomal puede ser α -L-iduronidasa (IDU). La enzima lisosomal puede ser α -glucosidasa ácida (GAA). La enzima lisosomal puede ser β -glucoronidasa (GUSB). La enzima lisosomal puede ser β -galactosidasa (GLB1).

Las células humanas adecuadas que se pueden usar en el ensayo basado en células incluyen cualquier célula humana que sea deficiente en la enzima lisosomal que se vaya ensayar, de manera que se puedan acumular los sustratos naturales para la enzima lisosomal. Por ejemplo, se pueden usar las células que presentan de forma natural una deficiencia total (100 %) o parcial de la actividad, por ejemplo, una reducción del 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o superior de la actividad. Se pueden usar células que expresen una enzima mutante con actividad disminuida, o células derivadas de pacientes que padecen una enfermedad por depósito lisosomal, por ejemplo, una mucopolisacaridosis. Se pueden usar células modificadas de forma recombinante para desactivar o reducir la actividad de la enzima lisosomal, por ejemplo, a través de la introducción de una mutación en el gen codificante o su promotor u otra región reguladora. Se pueden usar células tratadas para reducir la actividad de la enzima lisosomal, por ejemplo, tratadas con antisentido o ARNi para reducir la expresión de la enzima.

Las enzimas adecuadas que escinden (digieren) oligosacáridos pequeños de hidratos de carbono y que son "específicas de" (es decir, que digieren predominantemente) los sustratos naturales de la enzima lisosomal pueden ser seleccionadas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para la detección de la actividad de GALNS o GLB1 (enzimas que degradan el queratán sulfato), la enzima de la etapa (d) puede ser queratanasa II o cualquier enzima que actúe principalmente sobre el queratán sulfato. Como otro ejemplo, para la detección de IDU, ARSB, IDS o GUSB (las enzimas que degradan el sulfato de dermatán), la enzima de la etapa (d) puede ser condroitinasa ABC o cualquier enzima que actúe principalmente sobre el sulfato de dermatán. Como otro ejemplo, para la detección de IDU, IDS, SGHS, G6S o GUSB (las enzimas que degradan el sulfato de heparano), la enzima de la etapa (d) puede ser heparanasa I o heparanasa II, o ambas. Como otro ejemplo más, para la detección de GAA (una enzima que degrada el glicógeno), la enzima de la etapa (d) puede ser α -amilasa o cualquier enzima que actúa principalmente en el glicógeno.

Este método basado en células es capaz de tener una gran sensibilidad en la detección de la actividad de la enzima lisosomal. La actividad de la enzima lisosomal puede ser detectable cuando la concentración de enzima lisosomal es tan baja como de aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 5 nM, o aproximadamente 1 nM, o aproximadamente 0,75 nM, o aproximadamente 0,5 nM, o aproximadamente 0,25 nM, o aproximadamente 0,1 nM, o aproximadamente 0,05 nM, o aproximadamente 0,01 nM, o aproximadamente 0.005 nM, o aproximadamente 1 pM, o aproximadamente 0,5 pM.

III. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS SULFATASAS LISOSOMALES

El material de biorreactor que contenía la GALNS humana recombinante estaba filtrado de forma estéril de 0,2 μ m y mantenido a 4 °C. El material de biorreactor bien se cargó en una columna de captura directamente o se concentró de 10 a 20 veces mediante ultrafiltración antes de cargarlo en una columna de captura. Se ajustó el pH del material de biorreactor o material de biorreactor concentrado a pH 4,5 y luego se cargó en una columna de Blue-Sepharose, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 y acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0, y se eluyó con acetato/fosfato 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0. A continuación, se cargó el material eluido de la columna de Blue-Sepharose en Fractogel SE Hi-Cap, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0 y acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5, y se eluyó con acetato/fosfato 20 mM, gradiente de NaCl 50-350 mM, pH 5,5. El material eluido de Fractogel SE Hi-Cap se formuló en NaOAc 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, Tween-80 al 0,005 %, pH

5,5.

Como alternativa, el material de biorreactor que contenía GALNS humana recombinante se concentró 20 veces mediante ultrafiltración antes de cargarlo en una columna de captura. Se ajustó el pH del material de biorreactor concentrado a pH 4,5, se filtró y luego se cargó en una columna Fractogel SE Hi-Cap, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 y acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0, y se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 140 mM, pH 5,0. A continuación, se ajustó el material eluido de la columna Fractogel SE Hi-Cap a NaCl 500 mM, pH 7,0, y se cargó sobre una columna Sepharose quelante de Zn (Zn-IMAC), se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 10 mM, pH 7,0 y se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 90 mM, pH 7,0. Se ajustó el pH del material eluido de la columna Sepharose quelante de Zn (Zn-IMAC) a pH 3,5 para la inactivación vírica a bajo pH, se ajustó a acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0, y después se cargó en una columna ToyoPearl Butyl 650M, se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0, y se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 0,7 M, pH 5,0. Se sometió el material eluido de ToyoPearl Butyl 650M a ultrafiltración y diafiltración en acetato 20 mM, fosfato 1 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5, y después se formuló en acetato 20 mM, fosfato 1 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 5,5.

La purificación de GALNS humana recombinante se describe en detalle *infra*, y la purificación de GALNS humana recombinante siguiendo procedimientos modificados del protocolo anterior se describe en detalle *infra*.

Se expresó la enzima GALNS humana recombinante en células G71S como se describe en el Ejemplo III y se purificó como se describe en el Ejemplo V. La GALNS humana recombinante purificada de la invención se puede comparar con otros preparados documentados de GALNS. Masue *et al.*, *J. Biochem.* 110: 965-970, 1991, describieron la purificación y caracterización de GALNS de placenta humana. La enzima purificada resultó tener una masa molecular de 120 kDa, que consiste en los polipéptidos de 40 kDa y 15 kDa, el último de los cuales ha demostrado ser una glicoproteína. Por lo tanto, la enzima GALNS de Masue *et al.* parece corresponder a la forma procesada que se muestra en la Figura 5. Bielicki *et al.*, *Biochem. J.* 279: 515-520, 1991, describieron la purificación y caracterización de GALNS de hígado humano. Cuando se analizó mediante SDS-PAGE, la enzima tenía una masa molecular de 70 kDa en condiciones no reductoras y masas moleculares de 57 kDa, 39 kDa y 19 kDa en condiciones reductoras. Bielicki *et al.*, *Biochem. J.* 311:333-339, 1995, describieron la purificación y caracterización de GALNS humana recombinante de células de ovario de hámster chino. Se encontró que la enzima purificada en SDS-PAGE tenía una masa molecular de 58-60 kDa en condiciones no reductoras y las masas moleculares de 55 a 57 kDa, 39 kDa y 38 kDa en condiciones reductoras. Por lo tanto, las enzimas GALNS de Bielicki *et al.* parecen corresponder a una mezcla de la forma previamente procesada (precursor) de la enzima y la forma procesada mostrada en la Figura 5. Por el contrario, la enzima GALNS humana recombinante de la invención consiste casi en su totalidad en la forma precursora de la enzima (véase la Figura 9) o predominantemente (es decir, al menos aproximadamente el 85 %) de la forma precursora de la enzima (véase la Figura 10).

IV. ENZIMAS SULFATASAS LISOSOMALES Y ENFERMEDADES POR DEPÓSITO LISOSOMAL

La enzima sulfatasa lisosomal es una enzima de longitud completa o cualquier fragmento, mutante, variante o derivado de la misma que conserve al menos una cantidad sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 75 % y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %), esencialmente toda o toda la actividad terapéutica o biológica (por ejemplo, la actividad de sulfatasa) de la enzima.

En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal es una que, si no se expresa o produce, o si se reduce esencialmente en la expresión o producción, daría lugar a una enfermedad, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades por depósito lisosomal. En algunas realizaciones, la enzima sulfatasa lisosomal es una que, si no se expresa o produce, o si se reduce esencialmente en la expresión o la producción, no puede dar lugar a una enfermedad, pero cuyas ausencia o reducción de la expresión o de la producción están asociadas a la enfermedad, incluyendo pero sin limitación, enfermedades por depósito lisosomal. Preferentemente, la enzima sulfatasa lisosomal se deriva o se obtiene de un ser humano.

Preferentemente, en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal, la enzima sulfatasa lisosomal es una enzima que se encuentra en una célula que si no se expresa o se produce, o se reduce esencialmente en la expresión o producción, daría lugar a una enfermedad por depósito lisosomal. Como alternativa, en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal, la enzima sulfatasa lisosomal es una enzima cuya ausencia, o expresión o producción esencialmente reducidas están asociadas a la enfermedad, aunque su ausencia, o expresión o producción esencialmente reducidas, puede que no den lugar a la enfermedad. Preferentemente, la enzima sulfatasa lisosomal se deriva o se obtiene de un ser humano.

Preferentemente, la enzima es una enzima sulfatasa lisosomal, tal como arilsulfatasa A (ARSA) (n.º de acceso del GenBank NP_000478 (isoforma a), n.º de acceso del GenBank NP_001078897 (isoforma b) y otras variantes), arilsulfatasa B/N-acetilglucosamina 4-sulfatasa (ARSB) (n.º de acceso del GenBank P15848), iduronato-2-sulfatasa (IDS) (n.º de acceso del GenBank NP_000193 (isoforma a), n.º de acceso del GenBank NP_006114 (isoforma b)), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH) (n.º de acceso del GenBank NP_000190), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) (n.º de acceso del GenBank NP_002067) y galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) (n.º

de acceso del GenBank NP_000503). A continuación, se presenta una tabla de enfermedades por depósito lisosomal y las enzimas sulfatasas lisosomales deficientes en las mismas, que son útiles como agentes terapéuticos:

Enfermedad por depósito lisosomal	Deficiencia de sulfatasa lisosomal
Mucopolisacaridosis de tipo II, síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo	Sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IIID, síndrome de Sanfilippo	N-acetilglucosamina 6-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo IVA, síndrome de Morquio	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa
Mucopolisacaridosis de tipo VI	N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa
Leucodistrofia metacromática (MLD)	Arilsulfatasa A
Deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD)	Sulfatasas múltiples

- 5 En la mayoría de las realizaciones preferidas, la enzima sulfatasa lisosomal es una N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa.

10 Por lo tanto, las enfermedades por depósito lisosomal que se pueden tratar o prevenir usando los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, leucodistrofia metacromática o MLD, síndrome de Maroteaux-Lamy o MPS VI, síndrome de Hunter o MPS II, síndrome de Sanfilippo A o MPS IIIa, síndrome de Sanfilippo D o MPS IIId, síndrome de Morquio A o MPS IVa. En una realización particularmente preferida, la enzima sulfatasa lisosomal es tal que su deficiencia provoca el síndrome de Morquio A o MPS IVa. En otra realización particularmente preferida, la enzima sulfatasa lisosomal es tal que su deficiencia se asocia con una enfermedad por depósito lisosomal humana, tal como deficiencia múltiple de sulfatasa o MSD.

15 Por lo tanto, según la tabla anterior, para cada enfermedad, la enzima sulfatasa lisosomal comprendería preferentemente una enzima sulfatasa lisosomal activa específica deficiente en la enfermedad. Por ejemplo, para los métodos que implican MPS II, la enzima preferida es iduronato-2-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IIIa, la enzima preferida es sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IIID, la enzima preferida es N-acetilglucosamina 6-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS IVA, la enzima preferida es galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. Para los métodos que implican MPS VI, la enzima preferida es N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa. Para los métodos que implican leucodistrofia metacromática (MLD), la enzima preferida es arilsulfatasa A. Para los métodos que implican deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD), la enzima puede ser arilsulfatasa A, arilsulfatasa B/N-acetilglucosamina 4-sulfatasa, iduronato-2-sulfatasa, sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa, N-acetilglucosamina-sulfatasa o galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, y la enzima preferida es galactosa 6-sulfatasa/N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa.

V. MUCOPOLISACARIDOSIS DE TIPO IVA (SÍNDROME DE MORQUIO, MPS IVA)

30 La mucopolisacaridosis de tipo IVA (Síndrome de Morquio, MPS IV) es una enfermedad autosómica recesiva hereditaria que pertenece al grupo de enfermedades de almacenamiento de mucopolisacáridos. El síndrome de Morquio está causado por una deficiencia de una enzima lisosomal necesaria para la degradación de dos glicosaminoglicanos (GAG), el queratán sulfato (KS) y el condroitina-6-sulfato (C6S). En concreto, la MPS IVa se caracteriza por la ausencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), y la excreción de KS en la orina. La falta de GALNS da lugar a la acumulación de cantidades anormalmente altas de mucopolisacáridos en el cartilago hialino, un componente principal de los tejidos esqueléticos. Todos los pacientes tienen una displasia esquelética sistémica. Otros síntomas varían en cuanto a la gravedad de un paciente a otro, y pueden incluir la pérdida de audición, cataratas, inestabilidad espinal, enfermedad valvular cardíaca y problemas respiratorios, entre otros.

40 La GALNS hidroliza los enlaces de éster de sulfato de galactosa-6-sulfato de KS y N-acetilgalactosamina-6-sulfato de C6S. La GALNS humana se expresa como una proteína precursora de 55 a 60 kDa con solo 2 sitios potenciales de glicosilación unidos a asparagina. La manosa-6-fosfato (M6P) forma parte de los oligosacáridos presentes en la molécula de GALNS. M6P es reconocida por un receptor en la superficie celular lisosomal y, por consiguiente, es crucial para la absorción eficaz de la GALNS.

45 Como todas las sulfatasas, la GALNS necesita ser procesada por una enzima activadora de formilglicina (FGE) codificada por el gen del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) para obtener actividad. Debido a esta etapa de activación, que implica la modificación posterior a la traducción de un resto de cisteína del sitio activo en C α -formilglicina (FGly), la sobreexpresión de sulfatasas recombinantes puede conducir tanto a la producción de enzimas sulfatasas con baja actividad específica (es decir, una mezcla de enzimas sulfatasa activadas y no activadas) y con títulos bajos de producción (es decir, la degradación y/o la no secreción de sulfatasas no activadas).

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana altamente fosforilada activa útil para el tratamiento del Síndrome de Morquio y otras enfermedades, por ejemplo, deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD), que son causadas por o están asociadas a una deficiencia en la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. Dicha enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana altamente fosforilada activa tiene la capacidad de ubicarse en los tejidos en los que KS y C6S se acumulan, tiene niveles adecuados de M6P para la

absorción eficaz, tiene un porcentaje suficientemente alto de FGly en la actividad enzimática, y tiene niveles de producción relativamente altos.

Se ha de entender que los métodos de la invención descritos en el presente documento son aplicables a la producción de otras enzimas sulfatasas lisosomales, por ejemplo, arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B/N-acetilglucosamina 4-sulfatasa (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH) y N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S), útiles para el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal que están causadas o se caracterizan por su deficiencia en las mismas.

VI. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden administrar mediante una variedad de vías. Para los preparados orales, las enzimas sulfatasas lisosomales se pueden usar solas o en combinación con aditivos apropiados para fabricar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con desintegradores tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden formular en preparados para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolas en un disolvente acuoso o no acuoso tal como de origen vegetal u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden utilizar en la formulación de aerosol para su administración por inhalación. Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden formular en propulsores presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden preparar en supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden administrar por vía rectal a través de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilenglicoles, que se funden a la temperatura corporal, pero se solidifican a temperatura ambiente.

Se pueden proporcionar formas de dosificación unitarias de las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención para la administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de una enzima sulfatasa lisosomal que contiene agente activo. De manera similar, las formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender la enzima sulfatasa lisosomal como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el uso práctico, las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención se pueden combinar como el principio activo en mezcla íntima con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables de acuerdo con técnicas de preparación de compuestos farmacéuticos convencionales. El vehículo, diluyente o excipiente puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma preferible del preparado deseado para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones de enzimas sulfatasas lisosomales para la forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de los preparados líquidos orales, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de los preparados sólidos orales, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y comprimidos, prefiriéndose los preparados orales sólidos frente a los preparados líquidos.

Con respecto a las vías de administración transdérmica, los métodos para la administración transdérmica de fármacos se desvelan en "Remington Pharmaceutical Sciences", 17ª Edición, (Gennaro *et al.*, Eds. Mack Publishing Co., 1985). Los parches dérmicos o cutáneos son un medio preferido para la administración transdérmica de las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención. Los parches proporcionan preferentemente un promotor de la absorción tal como DMSO para aumentar la absorción de las enzimas sulfatasas lisosomales. Otros métodos para la administración transdérmica de fármacos se desvelan en la patente de EE.UU. n.º 5.962.012, 6.261.595 y 6.261.595.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, se encuentran disponibles en el mercado. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, también se encuentran disponibles en el mercado.

- En cada uno de estos aspectos, las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal incluyen, pero sin limitación, las composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, e intravenosa), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o nasal, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá en parte de la naturaleza y de la gravedad de las afecciones que se vayan a tratar y de la naturaleza del principio activo. Las vías de administración ilustrativas son las vías oral e intravenosa. Las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.
- Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso, como es evidente, se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales. El porcentaje de una enzima sulfatasa lisosomal activa en estas composiciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente del aproximadamente 2 por ciento al aproximadamente 60 por ciento del peso de la unidad.
- Las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal de la invención pueden administrarse encapsuladas en o unidas a envolturas virales o vesículas, o incorporadas a las células. Las vesículas son partículas micelares que normalmente son esféricas y que frecuentemente son lipídicas. Los liposomas son vesículas formadas a partir de una membrana de doble capa. Las vesículas adecuadas incluyen, pero sin limitación, vesículas unilaminares y vesículas lipídicas multilaminares o liposomas. Dichas vesículas y liposomas se pueden preparar a partir de una amplia gama de compuestos de lípidos o fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina, glicolípidos, gangliósidos, etc., usando técnicas convencionales, tales como las descritas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 4.394.448. Dichas vesículas o liposomas se pueden usar para administrar enzimas sulfatasas lisosomales intracelularmente y para suministrar enzimas sulfatasas lisosomales a los órganos diana. La liberación controlada de una enzima sulfatasa lisosomal de interés también se puede conseguir usando encapsulación (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.186.941).
- Se puede usar cualquier vía de administración que diluya la composición de enzima sulfatasa lisosomal en el torrente sanguíneo, o preferentemente, al menos fuera de la barrera hematoencefálica. Preferentemente, la composición de enzima sulfatasa lisosomal se administra periféricamente, lo más preferentemente por vía intravenosa o mediante un catéter cardíaco. Las inyecciones intrayugular e intracarotídea también son útiles. Las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal se pueden administrar de forma local o regional, tal como por vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En un aspecto, las composiciones de enzima sulfatasa lisosomal se administran con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función de la enzima sulfatasa lisosomal, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Las dosis preferidas para una enzima sulfatasa lisosomal dada pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la materia mediante una variedad de medios incluyendo, pero sin limitación, la respuesta a la dosis y las evaluaciones farmacocinéticas realizadas en pacientes, en animales de ensayo e *in vitro*.
- Las dosis que se van a administrar también pueden depender de las necesidades individuales, del efecto deseado, de la enzima sulfatasa lisosomal usada en particular y de la vía de administración escogida. Las dosis de una enzima sulfatasa lisosomal varían de aproximadamente 0,2 pmol/kg a aproximadamente 20 nmol/kg, las dosis preferidas varían de 2 pmol/kg a 2 nmol/kg, y las dosis particularmente preferidas varían de 2 pmol/kg a 200 pmol/kg. Como alternativa, las dosis de la enzima sulfatasa lisosomal pueden estar en el intervalo de 0,01 a 1.000 mg/kg, pudiendo estar las dosis preferidas en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, y las dosis particularmente preferidas varían de 0,1 a 10 mg/kg. Estas dosis estarán influidas por, por ejemplo, y sin limitación, la enzima sulfatasa lisosomal en particular, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración y el sitio de acción de la enzima sulfatasa lisosomal particular.
- Las enzimas sulfatasas lisosomales de la invención son útiles para la intervención terapéutica, profiláctica y de diagnóstico en los animales, y en particular, en los seres humanos. Las enzimas sulfatasas lisosomales pueden mostrar acumulación preferencial en determinados tejidos. Las indicaciones médicas preferidos para usos de diagnóstico incluyen, por ejemplo, cualquier afección asociada con un órgano diana de interés (por ejemplo, pulmón, hígado, riñón, bazo).
- Los presentes métodos encuentran uso en el tratamiento de una variedad de diferentes afecciones patológicas. En ciertas realizaciones, es de particular interés el uso de los presentes métodos en afecciones patológicas, en las que una enzima sulfatasa lisosomal que tiene actividad deseada se ha identificado previamente, pero en la que la enzima sulfatasa lisosomal no se suministra de manera adecuada en el sitio diana, en la zona o en el compartimento para producir un resultado terapéutico totalmente satisfactorio. Con dichas enzimas sulfatasas lisosomales, los presentes métodos de producción de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas se pueden usar para potenciar la eficacia terapéutica y el índice terapéutico de la enzima sulfatasa lisosomal.
- El tratamiento pretende englobar cualquier resultado beneficioso para un sujeto asociado con la administración de una enzima sulfatasa lisosomal incluyendo una menor probabilidad de adquirir una enfermedad, la prevención de una

5 enfermedad, la ralentización, detención o inversión de la progresión de una enfermedad o una mejora de los síntomas asociados con la afección patológica que padece el hospedador, donde la mejora o el beneficio se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, síntoma, asociado con la afección patológica que se esté tratando, tal como la inflamación y el dolor asociados con la misma. Como tal, el tratamiento también incluye situaciones en las que la afección patológica, o al menos los síntomas asociados con la misma, se inhiben completamente, por ejemplo, se evita que ocurran o se detienen, por ejemplo, se finalizan de modo que el hospedador ya no padezca la afección patológica, o al menos ya no padezca los síntomas que caracterizan la afección patológica.

10 Se puede tratar una variedad de hospedadores o sujetos de acuerdo con los presentes métodos. En general, dichos hospedadores son "mamíferos", en los que estos términos se usan ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase de los mamíferos, incluyendo los órdenes carnívoro (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los hospedadores serán seres humanos.

15 Habiendo ahora descrito la invención en general, la misma puede entenderse más fácilmente a través de la siguiente referencia a los siguientes ejemplos, que proporcionan protocolos ilustrativos para la producción y la purificación de enzimas sulfatasas lisosomales altamente fosforiladas activas y su uso en el tratamiento de enfermedades por depósito lisosomal. Los ejemplos se ofrecen con fines meramente ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, como es evidente, se deberían permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

25 Ejemplos

EJEMPLO I

VECTORES DE EXPRESIÓN DE MAMÍFERO PARA LA SULFATASA HUMANA

30 FACTOR 1 DE MODIFICACIÓN DE SULFATASA (SUMF1) Y N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA

El objetivo era construir vectores de expresión de mamífero adecuados para la producción en las células transfectadas de forma estable de cantidades adecuadas de enzimas sulfatasas lisosomales activas con los niveles de fosforilación mejorados.

Se clonó ADNc del factor de modificación 1 de sulfatasas (SUMF1) humano de longitud completa (véanse las solicitudes de patente de EE.UU. n.º US 20005/0123949, fecha de publicación del 9 de junio de 2005, y US 2004/0229250, fecha de publicación del 8 de noviembre de 2004), que codifica un polipéptido de 374 aminoácidos en el vector de expresión de mamífero cDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene el promotor del potenciador del CMV humano y un sitio de clonación múltiple. La terminación de la transcripción eficaz se aseguró mediante la presencia de la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El marcador de selección fue un gen de resistencia a la zeocina bajo el control del promotor EM-7 y la secuencia de poliadenilación temprana de SV40. El plásmido resultante se designó pcDNA4 SUMF1. Las secuencias del polinucleótido SUMF1 humano (SEQ ID NO: 1) y del polipéptido (SEQ ID NO: 2) se muestran en la Figura 1 y la Figura 2, respectivamente.

Se clonó ADNc de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa humana de longitud completa (GALNS) (véase Tomatsu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(2): 677-683, 1991), que codifica un polipéptido de 522 aminoácidos que incluye un péptido señal de 26 aminoácidos, en el vector de expresión de mamífero pCIN (BioMarin), que contiene el promotor del potenciador del CMV humano ligado al intrón IVS2 de β -globina de conejo y un sitio de clonación múltiple. La terminación de la transcripción eficaz se aseguró mediante la presencia de la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El marcador de selección fue un gen de neomicina fosfotransferasa que porta una mutación puntual para reducir la eficiencia de la enzima. El marcador atenuado fue todavía más perjudicado con el promotor HSV-tk débil. El plásmido resultante se denominó pCIN 4A. Las secuencias del polinucleótido GALNS humano (SEQ ID NO: 3) y del polipéptido (SEQ ID NO: 4) se muestran en la Figura 3 y la Figura 4, respectivamente.

Para aumentar los niveles de expresión de SUMF1 y de GALNS, se clonaron los elementos de la región de unión a la matriz (MAR)/armazón (véase Mermod *et al.*, patente de EE.UU. n.º 7.129.062) en los plásmidos de expresión de SUMF1 y GALNS.

60 BMAR SUMF1 se preparó mediante la digestión de MAR (Selexis) lleno de P<1_68 X_X NcoI con BamHI y HincII, y la posterior inserción del fragmento de MAR liberado en el pcDNA4 SUMF1 digerido con BglII y NruI.

65 PMAR SUMF1 se preparó mediante la digestión de SV40 EGFP (Selexis) (MAR) lleno de P<1_68 NcoI con HindIII y XbaI para eliminar el gen de EGFP, y la posterior inserción del gen de SUMF1, que se liberó de pcDNA4 SUMF1 mediante la digestión con HindIII y XbaI.

BMAR 4A se preparó mediante la digestión de BMAR SUMF1 con PmeI y SpeI para eliminar el gen de SUMF1, y la posterior inserción del gen de GALNS, que se liberó de pCIN 4A mediante la digestión con PmeI y SpeI.

5 PMAR 4A se preparó mediante la digestión de SV40 EGFP (Selexis) (MAR) lleno de P<1_68 NcoI con HindIII y XbaI para eliminar el gen de EGFP, y la posterior inserción del gen de GALNS, que se liberó de pCIN 4A mediante digestión con HindIII y XbaI.

10 También se clonó el ADNc de GALNS humana de longitud completa en el vector de expresión de mamífero pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). pcDNA4 SUMF1 se digirió con HindIII y XbaI para eliminar el ADNc de SUMF1, y pCIN 4A se digirió con HindIII y XbaI para aislar el ADNc de GALNS. El fragmento de HindIII/XbaI del ADNc de GALNS se ligó en el fragmento HindIII/XbaI del vector pcDNA4. El plásmido resultante se denominó pcDNA4-4A.

15 Se confirmó la integridad del gen GALNS en los vectores de expresión pCIN 4A, BMAR y pcDNA4-4A mediante cartografía de restricción usando las enzimas obtenidas de New England Biolabs. El vector de expresión PMAR 4A no fue cartografiado.

20 La estructura de la forma totalmente procesada de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana se representa en la Figura 5. La GALNS se expresa como un polipéptido de 522 aminoácidos con una secuencia de péptido señal de 26 aminoácidos. Se secreta un polipéptido GALNS de 496 aminoácidos como una forma preprocesada (precursor) de la enzima que tiene un peso molecular de aproximadamente 55-60 kDa. En la GALNS activa, el resto de cisteína de la posición 53 del precursor o polipéptido GALNS totalmente procesado (correspondiente a la posición 79 del polipéptido GALNS de longitud completa) se ha convertido en C α -formilglicina (FGly) mediante el factor modificar de sulfatasa 1 (SUMF1). En el lisosoma, GALNS se escinde después de la posición 325 del polipéptido GALNS totalmente procesado, dando lugar a fragmentos de péptido GALNS de aproximadamente 40 kDa y 19 kDa. Estos péptidos GALNS están unidos por un puente de disulfuro entre los restos de cisteína (C) de las posiciones 282 y 393 del polipéptido GALNS completamente procesado. Hay dos sitios de glicosilación ligada a N canónicos en las posiciones 178 y 397 del polipéptido GALNS completamente procesado. La manosa bis-fosforilada 7 (BPM7), que comprende 2 restos de manosa-6-fosfato, se ha encontrado en N178, pero no en N397.

30 EJEMPLO II

LÍNEAS CELULARES G71S QUE EXPRESAN CONJUNTAMENTE EL FACTOR DE MODIFICACIÓN 1 DE SULFATASAS (SUMF1) HUMANO Y N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA HUMANA (GALNS)

35 El objetivo era desarrollar líneas celulares capaces de producir enzimas sulfatasas lisosomales activas con mejores niveles de fosforilación.

40 Las células G71 (Rockford K. Draper) se derivaron directamente de CHO-K1 (ATCC CCL-61). La línea celular de G71 es un mutante sensible a la temperatura de CHO-K1 con respecto a la acidificación de los endosomas, que se ha observado que produce diferencias en la secreción total de proteínas y la fosforilación en los restos de manosa para varias enzimas a temperaturas elevadas (Park *et al.*, *Somat. Cell Mol. Genet.* 17(2): 137-150, 1991; Marnell *et al.*, *J. Cell. Biol.* 99(6): 1907-1916, 1984).

45 Las células G71 se mantuvieron a 34 °C en medio UltraCHO BioWhittaker suplementado con suero de ternero fetal al de 2,5 %, glutamina 2 mM, gentamicina y anfotericina.

50 Para permitir un uso más sencillo de las líneas celulares para la producción de proteínas, se adaptaron previamente las células G71 adherentes a un medio de crecimiento exento de suero usando un protocolo de adaptación de células de mamífero dependientes del suero, dependientes del anclaje al cultivo en suspensión exento de suero de alta densidad (Sinacore *et al.*, *Mol Biotechnol* 15 (3):249-257, 2000), dando lugar a la línea celular adaptada al cultivo en suspensión exento de suero, G71S. Como alternativa, las células G71 adherentes, después de haber sido transfectadas de manera estable como se describe *infra*, se pueden adaptar al medio de crecimiento exento de suero como se indica en Sinacore *et al.*

55 Las combinaciones por pares de los vectores de expresión de SUMF1 humano y de GALNS humano (Ejemplo I), ya sea pcDNA4 SUMF1 más pCIN4 4A, BMAR SUMF1 más BMAR 4A, o PMAR SUMF1 más PMAR 4A, se transfectaron siguiendo el protocolo MARtech II según lo descrito por Selexis en células G71S desarrolladas en medio de cultivo suplementado con solución de antibióticos-antimicóticos (100 UI de penicilina, 10 mg de estreptomycin, 25 µg de anfotericina B, Cellgro). Las combinaciones de transfectantes se cultivaron en medio UltraCHO (Cambrex) suplementado con suero bovino fetal irradiado con γ al 5 % (FBS, JRH), 200 µg/ml de G418 (AG Scientific) y 200 µg/ml de zeocina (Invitrogen), y se clonaron mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos en el mismo medio de crecimiento. Se controló el crecimiento de los clones mediante formación de imágenes de Cell Screen (Innovatis). Todos los clones se exploraron usando una actividad de captura de enzimas ELISA para GALNS activas (véase el Ejemplo IV).

65 Se calculó la productividad celular dividiendo la actividad de captura de enzimas ELISA para la actividad de GALNS mediante el crecimiento celular (Vi-cell, Beckman Coulter) al día, durante un período de 4 días.

Se generaron 202 clones de G71S y se exploraron en busca de GALNS activas: 86 clones cotransfectados con pcDNA4 SUMF1 más pCIN 4A, 65 clones cotransfectados con BMAR SUMF1 más BMAR 4A, y 51 clones cotransfectados con PMAR SUMF1 más PMAR 4A. Los clones se seleccionaron inicialmente basándose en niveles elevados de GALNS activa a partir de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Figura 6A). Se midió la actividad de GALNS usando una actividad de captura de enzimas ELISA y se representó en ng/ml (eje Y). El eje X muestra las tres condiciones de cotransfección usadas para la expresión de SUMF1 y GALNS: promotor de hCMV sin MAR, promotor de hCMV con MAR y promotor de SV40 con MAR. Cada barra representa un único clon de la población respectiva. La densidad celular no se explicó en esta exploración de clones de 96 pocillos, y no se muestran todos los clones de G71S cotransfectados en esta figura.

Se escogieron los clones de G71S productores de la GALNS más activa para el análisis de la productividad (Figura 6B). Se midió la productividad celular diaria en pg/célula/día y se obtuvo dividiendo la actividad de GALNS mediante la densidad celular para ese día. Esta figura muestra el cuarto día (96 horas) después de la siembra en 5×10^5 células/matraz. Se analizaron los clones para GALNS usando una actividad de captura de enzimas ELISA en pg/célula/día (eje Y). Los controles positivos consistieron en clones de BHK y CHO que expresaban GALNS (BioMarin). Cada barra vertical representa un único clon. La GALNS activa fue producida por los clones pCIN 4A, pero solo ligeramente por encima del fondo del ensayo.

Los análisis de los clones mediante exploración de 96 pocillos y ensayo de productividad de 4 días demostraron que la cotransfección de los vectores de expresión con elementos MAR aumentó la productividad de los clones de G71S en comparación con la cotransfección de los vectores de expresión sin elementos MAR. Los clones cotransfectados BMAR 4A + BMAR SUMF1 demostraron una rápida generación de la combinación, un rápido crecimiento de clones y la capacidad para producir GALNS 2 veces más activa que los clones PMAR 4A más productores, y un aumento de hasta 10 veces más frente a los clones CHO 4A y BHK 4A carentes de elementos MAR.

Los clones de G71S que expresaban GALNS se adaptaron al medio de cultivo exento de suero usando el protocolo descrito en la Sinacore *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 15(3): 249-257, 2000. Toda la adaptación se realizó en presencia de ambos agentes de selección (zeocina a 200 µg/ml y neomicina en 200 µg/ml). Los clones de G71 que expresaban GALNS cultivados en matraces T se dividieron de la siguiente manera: (1) en un agitador de 125 ml con el medio de Cambrex UltraCHO y FBS al 5 % (lote n.º 8L2242); (2) en un agitador de 125 ml con el medio JRH 302M (medio de producción) y FBS al 5 %; y (3) en matraces T como una copia de seguridad (UltraCHO, FBS al 5 %). Una vez que se establecieron los cultivos en suspensión, se desecharon las células adherentes y se inició el deshabitamiento a FBS. Cuando la tasa de crecimiento volvió a $> 0,5$ (l/día) durante 3 pases y la viabilidad fue > 95 %, se redujo la concentración de FBS en un 50 %. Se dejaron las células a cualquier concentración dada de FBS durante un mínimo de 3 pases. Una vez adaptadas al crecimiento en FBS al 2,5 %, se llevaron las células directamente a medios exentos de suero. Las células se almacenaron en medio fresco con DMSO al 10 % (v/v). Se probó una descongelación del ensayo para asegurar que las células sobrevivirían al proceso de congelación. Dos clones de G71S que expresaban GALNS de la transfección BMAR 4A + BMAR SUMF1, los clones 4 y 5 tuvieron aproximadamente 15 pases para la adaptación al cultivo en suspensión exento de suero. Un clon que expresaba GALNS de la transfección pcDNA4 SUMF1 más pCIN 4A, C6, también se aisló y se adaptó al cultivo exento de suero.

Las combinaciones por pares de los vectores de expresión de SUMF1 humano y GALNS humana (Ejemplo I), pcDNA4 SUMF1 más pCDNA4-4A, se transfectaron en células G71S básicamente como se ha descrito anteriormente, a excepción del uso de 200 µg/ml de zeocina (Invitrogen) para la selección. Se aislaron seis clones que expresaban GALNS, C2, C5, C7, C10, C11 y C30, y se adaptaron al cultivo en suspensión exento de suero, básicamente, como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO III

CULTIVO A GRAN ESCALA DE LINEAS CELULARES G71S QUE EXPRESABAN LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA

El objetivo era medir la producción de enzima de los clones de G71S que expresaban N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana. El cultivo en suspensión exento de suero adaptado a líneas celulares de G71S que expresaban conjuntamente SUMF1 humano y GALNS humana se cultivaron a gran escala y se evaluaron para determinar la producción de enzima GALNS activa.

Dado que la adaptación al cultivo en suspensión exento de suero fue relativamente rápida para la línea celular hospedadora G71S, se decidió que la producción podría hacerse en un biorreactor WAVE operado en modo de perfusión. El biorreactor WAVE permite una mayor flexibilidad en el volumen de inóculo porque el aumento a escala se puede hacer directamente en la bolsa, lo que reduce el riesgo de contaminación y acelera la producción de material. La Figura 7 muestra el esquema de configuración del biorreactor WAVE. El diagrama muestra, en el modo de perfusión, que una célula cargada controla el volumen de medio en la bolsa mediante la determinación del peso de la bolsa y el ajuste de las velocidades de suministro y de recogida para mantener el volumen deseado. En la bolsa de 10 l, el pH también se controla en la puesta a punto deseada mediante una sonda que se inserta en la bolsa.

El material de los clones de G71S que expresan GALNS 4 y 5 se produjo a la escala de 1 l. El pH del cultivo no se controló en estas series. La limitación de funcionamiento de la bolsa de WAVE es un rendimiento de 3 volúmenes de recipiente al día (VV/día). Con el fin de evitar cualquier inactivación del material, la velocidad de perfusión específica de células diana (CSPR) fue de 0,3 nl/célula/día, dando lugar a un tiempo de residencia medio de ocho horas para las enzimas GALNS. Por lo tanto, la densidad celular en la bolsa se mantuvo a aproximadamente $10\text{--}12 \times 10^6$ células/ml. La velocidad de crecimiento de los clones de G71S que expresaban GALNS 4 y 5 fue de 0,16 y 0,20, respectivamente. La recogida de sangre para mantener la densidad celular diana se realizó directamente de la bolsa.

Se ajustó el pH del líquido de lo recogido a un pH entre 5,5 y 6,5 para mantener la actividad enzimática, ya que previamente se había demostrado que GALNS era estable a pH 6. Esto se logró mediante una adición de bolo temporizada del 5 % en volumen de tampón de citrato de sodio a pH 4,0 mezclado en línea con lo recogido procedente del reactor. El fluido de lo recogido ajustado se almacenó a 4 °C antes del procesamiento cadena abajo. Los dos clones de G71S que expresan GALNS 4 y 5 promediaron títulos de aproximadamente 4,2 mg/l con una productividad específica asociada de aproximadamente 1,25 pg/célula/día.

Los clones de G71S que expresan GALNS, C2, C5, C6, C7, C10, C11 y C30, se cultivaron igualmente a gran escala y se evaluaron para determinar la producción de enzima GALNS activa.

EJEMPLO IV

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y DE LA ACTIVIDAD DE N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA

Se desarrollaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para medir la concentración de la enzima GALNS y la actividad de los clones de G71S que expresaban conjuntamente SUMF1 humano y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana.

Actividad de captura de enzimas ELISA

La actividad de captura de enzimas ELISA mide la actividad de la enzima GALNS en fase sólida, tras la captura mediante un anticuerpo específico anti-GALNS unido a una placa de ELISA.

Tampones. Tampón A (tampón de carbonato): se disuelven 3,09 gramos de Na_2CO_3 y 5,88 gramos de NaHCO_3 en 900 ml de H_2O desionizada (DI), a continuación, se añade H_2O DI hasta un volumen final de 1.000 ml. Se comprueba que el pH esté entre 9,4 y 9,6, y luego se filtra en condiciones estériles. Para recubrir por completo una microplaca de 96 pocillos con 100 μl por pocillo, se diluyen 19 μl de un anticuerpo anti-GALNS en un tubo (12 ml). Tampón B (tampón de bloqueo de ELISA y tampón de dilución en serie): 1 x PBS ácido, Tween-20 al 0,05 % y BSA al 2 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón B^w (tampón de lavado): NaOAc 100 mM y Tween-20 al 0,05 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón C (tampón de sustrato): acetato de sodio 25 mM, NaCl 1 mM, 0,5 mg/ml de BSA desalada y azida de sodio al 0,01 %, ajustado a pH 4,0 con ácido acético glacial. Tampón D (tampón de β -galactosidasa): fosfato de sodio dibásico 300 mM, 0,1 mg/ml de BSA, azida de sodio al 0,01 % y Tween-20 al 0,01 %, ajustado a pH 7,2 con ácido fosfórico. Tampón E (tampón de detención): tampón de glicina 350 mM y carbonato 440 mM, ajustado a pH 10,7 con NaOH 6 M.

Reactivos. Anticuerpo IgG anti-GALNS: se purifican los anticuerpos policlonales de conejo con proteína G del suero. En D-PBS, proteína total = 3,17 mg/ml (BCA). Las alícuotas (19 μl) se almacenan a -20 °C para su uso una sola vez cada una. Sustrato 4MU-Gal-6-S (Sólido; PM de 440): reserva 100 mM preparada en agua DI y almacenada a 4 °C. β -galactosidasa (Sigma G-4155): se diluye a 12 $\mu\text{g/ml}$ en Tampón D antes de su uso.

Protocolo: se une el anticuerpo anti-GALNS a la placa: se recubre una placa Nunc MaxiSorp de ELISA (Nalge/Nunc International, Fisher n.º 12-565-135) con anticuerpo anti-GALNS a una concentración final de proteína de 5 $\mu\text{g/ml}$ en Tampón A. Para preparar esta solución, se descongela una alícuota de 19 μl , se centrifuga brevemente (10 s) en una microcentrifugadora para recoger el líquido. Se transfieren los 19 μl a 12 ml de Tampón A. Se mezclan vigorosamente mediante inversión, después se vierten en un depósito, seguido de la carga de placa (100 μl por pocillo) usando una pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 4 °C durante una noche. Se retira el anticuerpo anti-GALNS no unido: se lava la placa inundando con Tampón B^w tres veces. Bloqueo: se bloquea la placa con Tampón B (320 μl por pocillo), luego se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Se prepara una serie de diluciones de las muestras de ensayo y del patrón de GALNS purificados (desconocidas) durante la etapa de bloqueo: el patrón se diluye en Tampón B hasta el extremo más alto del intervalo lineal del ensayo (128 ng/ml en la Fila A), después se diluye en serie (2 veces) en las filas B-G en una placa de 96 pocillos. El carril H blanco de tampón (es decir, sin enzima GALNS). En primer lugar, se preparan 500 μl de una concentración a 128 ng/ml en Tampón B. A continuación, se diluye en serie con factor de dilución de 2 en el Tampón B (250 μl en 250 μl) hasta llegar a 2 ng/ml. Se retira el tampón de bloqueo: tras la etapa de bloqueo, se desecha el Tampón B. Se unen las muestras de ensayo y el patrón de enzima GALNS a anticuerpo anti-GALNS: se carga la placa con 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de las muestras de ensayo y el patrón diluidas en serie (serie por

duplicado). Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Se retiran los inhibidores de GALNS: se lava la placa inundando con Tampón B^w, tres veces. Se añade sustrato de GALNS (primera reacción): se prepara suficiente solución de sustrato final para la carga de 100 µl por pocillo (preparada no más de 1 hora antes de su uso). Se diluye la reserva de 4MU-Gal-6-S (100 mM) a 1 mM en Tampón C. Se cargan 100 µl por pocillo. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 30 min. Se añade β-galactosidasa (segunda reacción): se añaden 50 µl de 12 µg/ml de β-galactosidasa en Tampón D a cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 15 min. Reacción de detención: se añaden 100 µl de tampón E (tampón de detención) a cada pocillo para ionizar el 4MU liberado. Transferencia a fluoroplaque: se transfieren (8 pocillos a la vez) 200 µl de los 250 µl de cada pocillo de la placa de ELISA a una placa de microvaloración de fondo plano negra sin tratar (Fluoroplate, Costar n.º 3915). Se lee la fluorescencia: se lee la placa en un lector de placas Gemini (Molecular Devices Corporation) usando el programa SOFTmax PRO (366 nm de excitación, 446 nm de emisión, 435 nm de corte).

ELISA DE GALNS

El ELISA de GALNS mide la concentración de la enzima GALNS en medio acondicionado de cultivo celular u otras muestras de proceso usando un inmunoensayo de tipo sándwich.

Tampones. Tampón A (tampón de carbonato): se disuelven 3,09 gramos de Na₂CO₃ y 5,88 gramos de NaHCO₃ en 900 ml de H₂O desionizada (DI), a continuación, se añade H₂O DI hasta un volumen final de 1.000 ml. Se comprueba que el pH esté entre 9,4 y 9,6, y luego se filtra en condiciones estériles. Para recubrir por completo una microplaca de 96 pocillos con 100 µl por pocillo, se diluyen 19 µl de un anticuerpo anti-GALNS en un tubo (12 ml). Tampón B (tampón de bloqueo de ELISA y tampón de dilución en serie): 1 x PBS ácido, Tween-20 al 0,05 % y BSA al 2 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón B^w (tampón de lavado): NaOAc 100 mM y Tween-20 al 0,05 %, ajustado a pH 6,5 con ácido acético. Tampón F (tampón de detención): H₂SO₄ 2 N: en 600 ml en total, se añaden 100 ml de H₂SO₄ 12 N y 500 ml de agua MilliQ.

Reactivos. Anticuerpo IgG anti-GALNS: se purifican los anticuerpos policlonales de conejo con proteína G del suero. En D-PBS, proteína total = 3,17 mg/ml (BCA). Las alícuotas (19 µl) se almacenan a -20 °C para su uso una sola vez cada una. Anticuerpo de detección conjugado con HRP (RIVAH): el anticuerpo conjugado final se diluye a 1:100 en D-PBS/BSA al 1 % y se almacena en alícuotas de 120 µl a -20 °C para su uso una sola vez. Kit de sustrato TMB EIA (BioRad n.º 172-1067).

Protocolo: se une el anticuerpo anti-GALNS a la placa: se recubre una placa Nunc MaxiSorp de ELISA (Nalge/Nunc International, Fisher n.º 12-565-135) con anticuerpo anti-GALNS a una concentración final de proteína de 5 µg/ml en Tampón A. Para preparar esta solución, se descongela una alícuota de 19 µl, se centrifuga brevemente (10 s) en una microcentrifugadora para recoger el líquido. Se transfieren los 19 µl a 12 ml de Tampón A. Se mezclan vigorosamente mediante inversión, después se vierten en un depósito, seguido de la carga de placa (100 µl por pocillo) usando una pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C (incubadora de convección) durante 2 h. No se usa el bloqueo en caliente. Se retira el anticuerpo anti-GALNS no unido: se lava la placa inundando con Tampón B^w tres veces. Bloqueo: se bloquea la placa con Tampón B (320 µl por pocillo), luego se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Se prepara una serie de diluciones de las muestras de ensayo y patrón de GALNS purificadas (desconocidas) durante la etapa de bloqueo: el patrón se diluye en Tampón B hasta el extremo más alto del intervalo lineal del ensayo (40 ng/ml en la Fila A), después se diluye en serie (2 veces) en las filas B-G en una placa de 96 pocillos. El carril H es blanco de tampón (es decir, sin enzima GALNS). En primer lugar, se preparan 500 µl de una concentración a 40 ng/ml en Tampón B. A continuación, se diluye en serie con factor de dilución de 2 en el Tampón B (250 µl en 250 µl) hasta llegar a 0,625 ng/ml. Se retira el tampón de bloqueo: tras la etapa de bloqueo, se desecha el Tampón B. Se unen las muestras de ensayo y el patrón de enzima GALNS a anticuerpo anti-GALNS: se carga la placa con 100 µl/pocillo de las muestras de ensayo y el patrón diluidas en serie (serie por duplicado). Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Lavado: se lava la placa inundando con Tampón B^w, tres veces. Se une el conjugado de anticuerpo de detección: se descongela una alícuota (120 µl) de anticuerpo RIVAH, se centrifuga brevemente (10 s) en una microcentrifugadora para recoger el líquido. Se diluyen los 120 µl en 11,9 ml de tampón B y se invierte el tubo vigorosamente para mezclar. Se vierten en el depósito y se añaden 100 µl por pocillo con la pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 30 min. Lavado: se lava la placa inundando con Tampón B^w, tres veces. Sustrato de TMB: se prepara la solución de sustrato final mediante la mezcla de 1,2 ml de la Solución B con 10,8 ml de Solución A. Se vierte en el depósito y se añaden 100 µl por pocillo con la pipeta multicanal. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 15 min. Solución de detención: se pipetea 12 ml de solución de detención de H₂SO₄ 2 N en el depósito y se añaden 100 µl por pocillo con la pipeta multicanal. Se toca suavemente para mezclar. Lectura de A450: se lee la placa en el lector de placas.

Ensayo de actividad específica de GALNS

El ensayo de actividad específica de GALNS mide la actividad enzimática de GALNS en solución usando un sustrato específico de GALNS.

Tampones. se usa H₂O MilliQ para todos los tampones. Tampón de dilución (DB): para 1 l de DB, se disuelven 1,74 ml de ácido acético, 0,75 g de acetato de sodio, 233,6 mg de NaCl, 2 ml de Tween-20 al 50 % y 10 ml de azida de sodio al 1 % en H₂O MilliQ, y se ajusta el pH hasta $4,0 \pm 0,5$ con NaOH 0,1 M si el pH es inferior a 3,95 y con ácido acético 0,1 M si el pH es superior a 4,05. Las concentraciones finales son: ácido acético 19,5 mM, acetato de sodio 5,5 mM, NaCl 1 mM, Tween-20 al 0,1 % y azida de sodio al 0,01 %. Tampón fosfato (PB): para 1 l de PB, se disuelven 13,9 g de NaH₂PO₄-H₂O y 55 g NaHPO₄-7H₂O en H₂O MilliQ, y se ajusta el pH a 7,2. La concentración final es NaPi 300 mM. Tampón de detección (SB): para 1 l de SB, se disuelven 26,2 g de glicina y 46,6 g de carbonato de sodio en H₂O MilliQ, y se ajusta el pH a 10,6 con NaOH. Tampón de ensayo (AB): se diluye la reserva de 4MU-Gal-6S a 1:50 en DB (2 mM final). Tampón de β -galactosidasa (β GB): 25 μ g/ml de β -galactosidasa en NaPi 300 mM, pH 7,2.

Reactivos. 4MU-Gal-6S: 100 mM en H₂O (Toronto Research Chemicals n.º de cat. M334480). β -galactosidasa: Sigma G-4155. 4-metilumbeliferona (patrón de 4MU): Sigma M-1381 (reserva 10 mM en DMSO).

Protocolo. Se realizan diluciones en serie de la enzima GALNS. Para la GALNS purificada y formulada (~1,5 mg/ml), se diluyen las muestras 1:10.000 en tubos de microcentrifugación de baja adhesión de proteínas (USA Scientific n.º de cat. 1415-2600) que contienen DB, antes de las diluciones en serie 1:1. Se disponen 100 μ l de DB en una placa de 96 pocillos de baja unión a proteínas. En la primera fila, pipeta de 100 μ l de muestra de GALNS. Ahora se diluye en serie (1: 1) descendientemente la placa (A-G en placas de 96 pocillos). No se añade muestra al pocillo H (en blanco). El intervalo lineal de este ensayo es de 1 a 75 ng/nulo. Se usa el mismo procedimiento para la preparación de la curva patrón de 4MU. Se diluye 4MU 10 mM en DMSO a 1:100 en DB. Se inicia la curva patrón de 4MU mediante la adición de 50 μ l de 4MU 50 μ M en el primer pocillo, luego se diluye en serie. Se añaden 50 μ l del sustrato diluido en AB (4MU-galactosa-6S 2 mM en DB) a una placa fluorescente de 96 pocillos. Se incubaba previamente el sustrato durante 10 minutos a 37 °C. Se añaden 50 μ l de las diluciones en serie de 100 μ l de GALNS y patrón de 4MU a los 50 μ l de sustrato en AB. Se incubaba a 37 °C durante 30 min (esta primera reacción elimina el sulfato del sustrato), se inactiva la primera reacción y se inicia la segunda reacción mediante la adición de 50 μ l de β -galactosidasa (se diluye reserva de β -galactosidasa a 25 μ g/ml en β GB). El fosfato inhibe GALNS y el aumento de pH también detiene la reacción de GALNS. El pH resultante está ahora en el intervalo de pH óptimo de las β -galactosidasas. Se incubaba esta segunda reacción durante 15 min a 37 °C. Se ioniza el 4MU liberado mediante la adición de 100 μ l de SB. Se lee EX355 Em460 en el lector de placa fluorescente de 96 pocillos. Cálculos de actividad enzimática (a 37 °C en tampón a pH 4,0): 1 unidad = μ mol de 4MU liberados/min; actividad = μ mol de 4MU/min/ml; actividad específica = μ mol de 4MU/min/mg. Cálculo de la concentración de proteína: se usa el coeficiente de extinción de GALNS (1 mg/ml = 1.708 unidades de absorbancia a 280 nm).

EJEMPLO V

PURIFICACIÓN DE N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA

El objetivo era obtener una gran cantidad de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante. Se cultivaron células G71 transfectadas de forma estable que expresaban conjuntamente el SUMF1 humano y GALNS humana en condiciones de cultivo del biorreactor, y la enzima GALNS activa se purificó a partir del medio celular.

Aparato de cromatografía de líquidos. Sistema explorador 900 AKTA Amersham Pharmacia Biotech, usando el software de control Unicorn.

Métodos de análisis de proteínas. Se siguieron los procedimientos convencionales mediante SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie (B101-02-COOM), transferencia Western y ensayos de proteínas de Bradford. Las series de purificación se evaluaron mediante el rendimiento de la actividad, y la pureza del producto de GALNS se evaluó visualmente mediante SDS-PAGE. La presencia de impurezas procesadas se detectó mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-GALNS. La concentración de proteínas se midió usando un ensayo de proteínas de Bradford. La concentración de la proteína GALNS final purificada se midió mediante medición de A₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1,708.

Resinas de cromatografía. Blue Sepharose 6 FF (GE Healthcare, n.º de lote 306346) y Fractogel SE Hi-Cap (Merck KGaA, FC040894449).

Determinaciones de la actividad enzimática de GALNS. Se determinó la actividad específica de GALNS usando un pequeño sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil-6-S-GAL (4-MU-6-S-GAL). El ensayo de actividad específica de GALNS implica una reacción de dos etapas, en la que la adición de β -galactosidasa es necesaria después de la incubación de GALNS con el sustrato durante un cierto tiempo para liberar el marcador fluorescente. Las mediciones se realizan usando un lector de placas de fluorescencia.

Se equilibró una columna de desalación 10DG (Bio-RAD) con tampón de equilibrado (EQB, NaOAc 50 mM, NaCl 10 mM, pH 5,8). Se usó H₂O MilliQ para todos los tampones. Se cargaron tres (3) ml de GALNS purificada (0,5-2 mg/ml) en la columna de desalado, se eluyó y se recogió en alícuotas de 4 ml en tubos de ensayo separados usando EQB. La concentración de proteína se calculó usando el coeficiente de extinción de GALNS (1 mg/ml = 1,708 unidades de

absorbancia a 280 nm).

Las muestras de GALNS desaladas se diluyeron en serie (1:1) en tampón de dilución (DB, NaOAc 50 mM, NaCl 1 mM, pH 4,0 + 0,5 mg/ml de BSA). Se desaló la reserva de BSA antes de usarla mediante la carga de 50 mg/ml de reserva de BSA (no más de 5 % de VC) en una columna de G25 previamente equilibrada con H₂O MilliQ. Se pipetearon 100 µl de la muestra de GALNS desalada en la primera fila de una placa de 96 pocillos de baja unión de proteína, y las muestras de GALNS diluidas en serie se pipetearon hacia abajo de la placa (filas A-G en placas de 96 pocillos). Se pipetearon 100 µl de DB en el último pocillo (H). El extremo superior del intervalo lineal de este ensayo es de 200 ng/ml, y el intervalo lineal es de 3-200 ng/ml. Se realizó el mismo procedimiento para la preparación de la curva patrón con 4-metilumbeliferona (4MU) (Sigma M-1381, reserva 10 mM en DMSO). Se transfirieron 50 µl de las diluciones en serie de 100 µl de GALNS y 4MU a una placa fluorescente nueva de 96 pocillos (placa de fondo negro). Se añadieron 50 µl de 4MU-galactosa-6S 2 mM (en H₂O MilliQ) a las muestras que se iban a ensayar, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se inactivó esta primera reacción, y se inició una segunda reacción mediante la adición de 50 µl de β-galactosidasa (Sigma G-4155, reserva diluida hasta 12 µg/ml en NaPi 300 mM, pH 7,2), y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se ionizó el 4MU liberado mediante la adición de 100 µl de tampón de detención (Glicina/carbonato, pH 10,6). Se leyeron las placas en un lector de placa fluorescente de 96 pocillos (excitación a 355 nm, emisión a 460 nm). 1 Unidad se define como 1 µmol de 4MU liberado/min, la actividad enzimática se da en µmol de 4MU/min/ml, y la actividad específica se da en µmol de 4MU/min/mg, todo a 37 °C en tampón de pH 4,0.

20 *Primer proceso de purificación.* Un primer proceso de purificación incluye una etapa de ultrafiltración (UF), seguida de un proceso de purificación de 2 columnas.

1. Filtración de lo recogido (HF): el material del biorreactor se filtró de forma estéril a través de 0,2 µm.
2. Ultrafiltración (UF): el material del biorreactor se concentró de 10 a 20 veces mediante ultrafiltración a través de una membrana Sartoon de 30 kD.
3. Ajuste a pH 4,5: se ajustó el material del biorreactor concentrado (UF (x 20)) a pH 4,5 con tampón de ajuste del pH (NaOAc 1,75 M, pH 4,0) a temperatura ambiente y se filtró de forma estéril antes de cargarlo en una columna de Blue Sepharose.
4. Blue Sepharose 6 Fast Flow (FF): se cargó el UF ajustado a pH 4,5 (x 20) en una columna de Blue Sepharose y se eluyó la proteína GALNS como se muestra en la Tabla 1 y la Figura 9A.

Tabla 1: Cromatografía Blue Sepharose 6 Fast Flow

Etapa	VC*	Tampón
Equilibrado	5	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5
Carga		Producto de UF, ajustado a pH 4,5, filtrado
Lavado 1	4	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5
Lavado 2	8	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0
Elución	8	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0
Separación	5	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,0
Desinfección	4	NaOH 0,1 N, 0,5 horas
Regeneración	5	H ₂ O
Almacenamiento	3	ETOH al 20 %

*CV: volúmenes de columna. Caudal = 92 cm/h

5. Fractogel SE Hi-Cap: se ajustó el material eluido de la columna de Blue Sepharose a pH 4,3 y se cargó en una columna Fractogel SE Hi-Cap, y se eluyó la proteína GALNS como se muestra en la Tabla 2 y la Figura 9B.

Tabla 2: Cromatografía Fractogel SE Hi-Cap

Etapa	VC*	Tampón
Equilibrado	5	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,3
Carga		Material eluido de Blue Sepharose ajustado a pH 4,3, y diluido 1:1 con agua MQ
Lavado 1	5	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0
Lavado 2	5	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5
Elución	20	Acetato/fosfato 20 mM, gradiente de NaCl 50-350 mM, pH 5,5
Regeneración 1	5	Acetato/fosfato 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,3
Regeneración 2	5	NaOH 0,5 N, 0,5 horas
Desinfección	5	H ₂ O
Regeneración 3	4	ETOH al 20 %
Almacenamiento	3	

*CV: volúmenes de columna. Caudal = 150 cm/h

Se recogió la proteína GALNS del material eluido mediante fraccionamiento, desechando el hombro de prelución y la

cola de postelución.

6. UF/HF final: el material eluido de la columna Fractogel SE Hi-Cap se concentró mediante ultrafiltración y se filtró de forma estéril como se ha descrito anteriormente.

Formulación. La proteína GALNS purificada se formuló en NaOAc 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, Tween-80 al 0,005 %, pH 5,5.

Estudios de estabilidad. Se controló la estabilidad de la GALNS purificada formulada final a 4 °C y -70 °C en función del tiempo mediante el almacenamiento de pequeñas alícuotas de las muestras de GALNS a las respectivas temperaturas. En ciertos puntos de tiempo, se descongelaron las alícuotas de las muestras congeladas rápidamente en un baño de agua a 37 °C antes de las mediciones de la actividad. La Figura 8 muestra que la GALNS purificada fue estable a 4 °C y -70 °C durante un período de hasta al menos 79 días en el tampón de formulación.

Resultados del primer proceso de purificación. La tabla 3 muestra los rendimientos de purificación para tres preparados de proteína GALNS producidos a partir del clon 4 de G71S en un biorreactor de cultivo en suspensión. La pureza se estimó visualmente mediante SDS-PAGE en aproximadamente el 95 % de todos los casos.

Tabla 3: Rendimientos de purificación de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana del Clon 4 de G71S del Reactor WAVE

Etapas	Rendimiento			Media	Desviación típica
	Prep 1	Prep 2	Prep 3		
UF	N/A	100	100	100	0
Blue Sepharose 6 FF	93	103	101	99	5,3
SE Hi-Cap	90	87	90	89	1,7

La Figura 9 muestra una SDS-PAGE de la proteína GALNS separada mediante (A) cromatografía Blue Sepharose 6 Fast Flow seguida de (B) cromatografía Fractogel SE Hi-PAC. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (izquierda) o anticuerpo anti-GALNS (derecha). Para las transferencias Western, se diluyó el anticuerpo de conejo anti-GALNS a 1:5000, y el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de conejo anti-fosfatasa alcalina. La proteína GALNS tiene un peso molecular aparente de ~55-60 kDa en SDS-PAGE, de acuerdo con el tamaño esperado de la forma secretada previamente procesada (precursor) de la enzima carente del péptido señal de 26 restos de aminoácido, y también carente de la escisión después de la posición 325.

Caracterización N-terminal. El extremo N-terminal de la proteína GALNS purificada se determinó mediante LC/MS. La secuencia N-terminal fue APQPPN, que corresponde al extremo N-terminal predicho de la forma secretada de GALNS carente del péptido señal de 26 restos de aminoácido (comparar las secuencias de polipéptidos GALNS humanos en la Figura 4 y la Figura 5).

Segundo proceso de purificación. Un segundo proceso de purificación incluyó una etapa de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) seguida por un proceso de purificación de 3 columnas.

1. Ultrafiltración (UF/DF): se concentró el material del biorreactor 20 veces mediante ultrafiltración/diafiltración a través de una membrana Sartocoon de 30 kD a pH 5,5.

2. Ajuste pH 4,5: se ajustó el material del biorreactor concentrado (UF/DF (x 20)) a pH 4,5 con tampón de ajuste del pH (NaOAc 1,75 M, pH 4,0) a temperatura ambiente y se filtró de forma estéril antes de la carga en una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap.

3. Fractogel EMD SE Hi-Cap: se cargó UF/DF (x 20) de pH 4,5 ajustado en una columna Fractogel EMD SE Hi-Cap, se lavó secuencialmente con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 4,5 y acetato/fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, pH 5,0, y la proteína GALNS se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 140 mM, pH 5,0.

5. Sepharose FF quelante de Zn: se ajustó el material eluido de la columna Fractogel EMD SE Hi-Cap a NaCl 500 mM, pH 7,0 y se cargó en una columna de Sepharose FF quelante de Zn (Zn-IMAC), se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 10 mM, pH 7,0, y la proteína GALNS se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 125 mM, imidazol 90 mM, pH 7,0.

6. Ajuste a pH 3,5: se ajustó el material eluido de la columna de Sepharose FF quelante de Zn que contiene la proteína GALNS a pH 3,5 para la inactivación vírica a bajo pH y luego se ajustó a acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0.

7. ToyoPearl Butyl 650M: se cargó el material eluido ajustado a pH bajo de la columna de Sepharose FF quelante de Zn en una columna ToyoPearl Butyl 650M, se lavó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 2 M, pH 5,0, y la proteína GALNS se eluyó con acetato/fosfato 10 mM, NaCl 0,7 M, pH 5,0.

8. UF/HF final: el material eluido de la columna ToyoPearl Butyl 650M se sometió a ultrafiltración y diafiltración en acetato 20 mM, fosfato 1 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5.

5 *Formulación.* La proteína GALNS purificada se formuló en NaOAc/HOAc 10 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,01 %, pH 5,5.

10 *Resultados del segundo proceso de purificación.* La Tabla 4 muestra la recuperación de la proteína GALNS producida a partir del clon C2 de G71S en un biorreactor de cultivo en suspensión usando el segundo proceso de purificación. La pureza de la enzima GALNS formulada (es decir, precursor y formas madura o procesada juntos) fue del aproximadamente 98 %, determinada mediante RP-HPLC C3. El porcentaje de la forma precursora de la enzima GALNS fue del aproximadamente 85 % determinada mediante electroforesis en gel de SDS-capilar.

15 Tabla 4: Recuperación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana del clon C2 de G71S

Etapas de proceso	Recuperación (%)
Ajuste del pH	96
Columna Fractogel SE Hi-Cap	98
Columna Zn-IMAC	89
Inactivación vírica a bajo pH	89
Columna ToyoPearl Butyl 650M	99
Formulación	99
Global	70

20 La Figura 10 muestra una SDS-PAGE de la enzima GALNS separada mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), cromatografía de Fractogel SE Hi-CAP, cromatografía Sepharose FF quelante de Zn y cromatografía ToyoPearl Butyl 650M. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (parte superior izquierda), anticuerpo anti-GALNS (parte superior derecha), anti-catepsina L (parte inferior izquierda) y proteínas anti-CHO (CHOP, parte inferior derecha). Para las transferencias Western, se diluyó el anticuerpo policlonal de conejo anti-GALNS a 1:5000, y el anticuerpo secundario fue un conjugado de AP anti-conejo; el anticuerpo policlonal de cabra anti-catepsina L se diluyó a 1:1000, y el anticuerpo secundario fue un conjugado de HRP anti-cabra; y el anticuerpo policlonal de conejo anti-CHOP se diluyó a 1:1000, y el anticuerpo secundario fue un conjugado de anti-HRP de conejo. La enzima GALNS precursora tiene un peso molecular aparente de ~55-60 kDa en SDS-PAGE, y las formas madura o procesada de la enzima GALNS tienen pesos moleculares aparentes de ~39 kDa y ~19 kDa en SDS-PAGE.

30 *Resumen del primer proceso de purificación.* La enzima GALNS se purificó usando un tren de purificación que se había modificado con respecto a un tren convencional (véase la Tabla 5). El material recogido del biorreactor se filtró de forma estéril a través de 0,2 µm y se mantuvo a 4 °C antes de cargarlo en la columna de captura Blue-Sepharose. El material filtrado del biorreactor se cargó bien directamente o concentrado hasta 15 veces mediante ultrafiltración. La modificación del tren de purificación fue necesaria porque las etapas de purificación corriente abajo, la cromatografía de SP Sepharose seguida de la cromatografía de Phenyl Sepharose, no produjo GALNS suficientemente pura. El uso de la cromatografía SE Hi-Cap como reemplazo de las dos columnas de purificación de corriente abajo dio lugar a un proceso de purificación de 2 columnas, con la pureza de material final mejorada significativamente, y la recuperación global de GALNS significativamente aumentada del ~22 % al ~80 %. La pureza de la enzima GALNS (que consiste esencialmente en la forma precursora, véase la Figura 9), determinada mediante cromatografía C4-RP, se estimó aproximadamente en > 95 %, y la enzima GALNS purificada se mantuvo estable en tampón de formulación durante más de 79 días tanto a 4 °C como a -70 °C.

40 Tabla 5: Primer tren de purificación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

Etapas	Proceso normal	Proceso modificado
1	HF (x1)	HF (x1)
2*	UF (x5)	UF (x5)
3	Ajuste a pH 4,5	Ajuste a pH 4,5
4	Blue-Sepharose 6 FF	Blue-Sepharose 6 FF
5	SP Sepharose	SE Hi-Cap
6	Phenyl Sepharose Hi-Sub	UF/DF final
7	UF/DF final	
*Esta etapa es opcional.		

45 *Resumen del segundo proceso de purificación.* La enzima GALNS también se purificó usando un segundo tren de purificación (véase la Tabla 6). La recuperación global de GALNS fue del aproximadamente 70 % y la pureza de la enzima GALNS (incluyendo tanto el precursor como las formas madura o procesada, véase la Figura 10), determinada mediante cromatografía C4-RP, se estimó en aproximadamente el 97 %.

Tabla 6: Segundo tren de purificación de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana

Etapa	Proceso
1	HF (x1)
2	UF/DF (x20)
3	Ajuste a pH 4,5
4	SE Hi-Cap
5	Sepharose quelante de Zn
6	Ajuste a pH 3,5
7	ToyoPearl Butyl 650M
8	UF/DF final

Estos ensayos indican que los protocolos descritos anteriormente para la preparación de enzimas sulfatasas lisosomales recombinantes proporcionan un método eficaz de producción de grandes cantidades de la enzima altamente purificada, en particular, la forma preprocesada secretada (precursor) de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana.

EJEMPLO VI

CARACTERIZACIÓN DE N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA PURIFICADA

Las líneas celulares G71 producen proteínas (por ejemplo, enzimas lisosomales) con mayores niveles de fosforilación de alto contenido en manosa que los observados en una línea celular de mamífero media, y un nivel correspondientemente menor de oligosacáridos de alto contenido en manosa sin fosforilar. Una enzima sulfatasa lisosomal (por ejemplo, la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante), que comprende un alto nivel de oligosacáridos de alto contenido en manosa bis-fosforilados, como se define en el presente documento, se compara con las moléculas obtenidas en Canfield *et al.*, patente de EE.UU. n.º 6.537.785, que no comprenden oligosacáridos complejos, y muestran solo los oligosacáridos de alto contenido en manosa.

Para determinar los niveles de alto contenido en manosa sin fosforilar en una enzima sulfatasa lisosomal, un experto en la materia puede usar la secuenciación con exoglicosidasa de los oligosacáridos liberados ("secuencia FACE"), para determinar los porcentajes de cadenas de oligosacáridos de alto contenido en manosa sin fosforilar. En un gel normal de perfiles FACE de liberación por lotes, el alto contenido en manosa sin fosforilar migra junto con determinados oligosacáridos complejos (por ejemplo, oligomanosa 6 y complejo biantenarico totalmente sialilado). El alto contenido en manosa sin fosforilar se diferencia entonces de los otros oligosacáridos mediante secuenciación enzimática.

Para determinar si la enzima sulfatasa lisosomal purificada (por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante) expresada en células G71S presenta una mayor fosforilación, se determinó el nivel de manosa-6-fosfato (M6P) de la enzima sulfatasa lisosomal, así como la capacidad de la enzima para unirse al receptor de M6P (MPR).

Se analizó la enzima GALNS humana recombinante, expresada en células G71S y purificada, mediante electroforesis de hidratos de carbono asistida por fluorescencia (FACE) y mediante cromatografía sobre resina de MPR-Sepharose. El sistema FACE usa electroforesis en gel de poliácridamida para separar, cuantificar y determinar la secuencia de los oligosacáridos liberados de las glicoproteínas. La intensidad relativa de la banda de oligomanosa 7 bis-fosfato (O7P) de la FACE (Hague *et al.*, "Electrophoresis" 19(15): 2612-20, 1998) y el porcentaje de actividad conserva en la columna de MPR (Cacia *et al.*, "Biochemistry" 37(43): 15154-61, 1998) dan medidas fiables del nivel de fosforilación por mol de proteína.

Actividad específica. Se determinó la actividad específica de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante usando un pequeño sustrato fluorescente de 4-metilumbeliferil-6-S-GAL (4MU-Gal-6S) a 37 °C. Usando este ensayo, la actividad específica de la GALNS purificada fue de 165 µmol/min/mg (0,165 U/mg).

Estabilidad en suero humano. Se determinó la estabilidad en suero *ex vivo* de la GALNS. Se filtró suero humano (Sigma H-4522) de forma estéril a través de un filtro de PES de 0,2 µm, y se preincubaron 4 ml del suero humano filtrado de forma estéril en un matraz de cultivo de células T-25 durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 10 % (el pH en este punto es 7,4 ± 0,1). Se añadieron 0,4 ml de GALNS purificada, desalada (se desalaron 2 mg/ml de GALNS purificada en PBS usando columnas Bio-RAD 10DG) al suero humano preincubado o un control de PBS que contenía 0,5 mg/l de BSA. Se retiraron muestras de 100 µl en los puntos de tiempo designados (por ejemplo, 0, 1, 3,5, 7,5 y 26 horas) y se añadieron a 900 ml de tampón de inactivación (QB, NaOAc 50 mM, pH 5,6 + NaCl 150 mM + 0,5 mg/ml de BSA + Tween-80 al 0,001 %). Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta que estuvieron listas para la medición de la actividad de la enzima GALNS.

La actividad de la enzima GALNS se midió usando la actividad de captura de enzimas ELISA. Mediante extrapolación

de la curva de caída exponencial del % de actividad de la enzima GALNS residual, la semivida en suero *ex vivo* de la GALNS purificada se estimó en 217 horas.

Absorción en sinoviocitos (condrocitos). Se determinó la capacidad de GALNS que se ha de captar en los sinoviocitos (condrocitos).

Los condrocitos (Número ATCC CRL-1832) se cultivan en medio de crecimiento (F12 de Ham + FBS al 10 %) a 37 °C en CO₂ al 5 % en placas de 12 pocillos. El análisis de la absorción de tres muestras requiere 4 placas de 12 pocillos. Se diluyeron las muestras de GALNS purificada y una referencia de GALNS a 1 µM en acPBS/BSA (PBS ácido + 200 µg/ml DE BSA). A partir de reservas de 1 µM, se prepararon curvas de dilución de absorción para las muestras y la referencia de GALNS: 50,5 µl (rhASB 1 µM) en 5 ml de diluyente de ensayo de absorción (UAD, DMEM + L-glutamina 2 mM + 0,5 mg/ml de BSA), resultando en muestras y referencia de GALNS 10 nM, que se diluyeron adicionalmente en serie a 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 y 0,16 nM mediante diluciones en serie de factor de dilución de dos en UAD. Se aspiró el medio de crecimiento de las placas de 12 pocillos de condrocitos confluentes, se añadió 1 ml bien de UAD (blanco) o diluciones en serie de las muestras o referencias de GALNS a los pocillos, y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 10 %. Se aspiró el medio de absorción, inclinando cada plato por completo, y se enjuagó cada pocillo una vez con 1 ml de PBS. Se aspiró el PBS y se separaron los condrocitos mediante la adición de 0,5 ml de tripsina/EDTA (tripsina al 0,25 %/EDTA al 0,1 % (Mediatech 25-053-CI, lote 25053025)) por pocillo. Tras separarlos de la placa, se dividieron los condrocitos en partes alícuotas en tubos Eppendorf previamente enfriados en hielo (30 tubos en total). Se enfriaron los condrocitos tripsinizados y después se sedimentaron a baja velocidad en una microcentrifugadora (4.000 rpm durante 3 minutos). Se aspiró la tripsina completamente, se lavó el sedimento celular con 1 ml de PBS, repitiendo las etapas de microcentrifugación y aspiración una vez. Se añadieron 200 µl de tampón de lisis celular (CLB, acetato de sodio 50 mM, pH 5,6 + Triton X-100 al 0,1 %) a cada tubo. Se volvieron a suspender los sedimentos mediante agitación con formación de vórtice tres veces. Después de la resuspensión, las mezclas de lisis celular se almacenaron durante una noche a -80 °C o se analizaron directamente.

Se descongelaron los lisados celulares a temperatura ambiente y se transfirieron a hielo cuando se descongelaron. Se agitaron los lisados celulares con formación de vórtice para volver a suspender cualquier material sólido visible, y luego se centrifugaron en la microcentrifugadora a 14 Krpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo conjunto de tubos y se desechó el sedimento. A continuación, se realizó el ensayo de la actividad de GALNS en los sobrenadantes. Normalmente, se realiza una curva de dilución de siete puntos (diluciones en serie de factor de dilución de dos a partir de 10 nM y terminando a 0,16 nM) que soporta la $K_{\text{absorción}}$ esperada de manera bastante uniforme en ambos lados. La molaridad de las muestras de partida se calcula usando el peso molecular de solo la proteína.

La GALNS purificada resultó tener una K_d para la absorción en sinoviocitos, basada en la unión al ligando de un solo sitio, de 4,9 nM.

Ensayo de unión a la placa del receptor de manosa-6-fosfato (M6P). Se determinó la capacidad de GALNS para unirse al receptor de manosa-6-fosfato (M6P) en un ensayo de unión en placa. Se recubrieron placas de unión alta FluoroNunc con 4 µg/ml de receptor de M6P. Se lavaron las placas dos veces con 250 µl/pocillo de tampón de lavado (WB, TBS + Tween 20 al 0,05 %) y se bloqueó la unión inespecífica con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo y dilución (BDB, tampón Pierce SuperBlock, n.º de lote CA46485). Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Durante esta etapa de bloqueo, se diluyeron las muestras de GALNS purificada (0,5-2 mg/ml almacenadas a 4 °C durante 2 semanas) a 10 nM en BDB, y después se diluyeron en serie en tampón de dilución (DB, NaOAc 50 mM, NaCl 1 mM, pH 4,0 + 0,5 mg/ml de BSA) (250 µl + 250 µl) hasta 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 y 0,16 nM. Se lavaron las placas bloqueadas con WB como antes, y se dispensaron las muestras de GALNS diluidas en los pocillos por duplicado a 100 µl/pocillo y se incubaron 1 hora a TA. Durante esta etapa de incubación, se preparó el sustrato de actividad 2 mM diluyendo 0,1 ml de la reserva de 6S-galactosa-4MU 100 mM (almacenada en H₂O, -20 °C) en 5 ml de DB, y se calentó previamente en un baño de agua a 37 °C. Después de la incubación, se lavaron las placas dos veces con WB como antes, y se añadieron 100 µl de sustrato diluido y se determinó la actividad específica de GALNS

Usando el ensayo, la GALNS purificada resultó tener una K_d para la unión al receptor de M6P, basada en la unión a un solo sitio, de 2,4 nM.

Unión a la columna del receptor de manosa-6-fosfato (M6P). La capacidad de GALNS para unirse al receptor de manosa-6-fosfato (M6P) se determinó en un ensayo de unión a la columna. Se preparó una columna de receptor de M6P de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El receptor de M6P era del laboratorio de Peter Lobel, la resina de la columna era resina de NHS activada (Bio RAD Affi-Gel 15) y el tamaño de la columna era de 0,7 ml. Se equilibró la columna de receptor de M6P con 10 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrado (EQ, PBS ácido, pH 6,0 que contenía β-glicerofosfato 5 mM, Tween 20 al 0,05 %, glucosa-1-fosfato 5 mM y NaN₃ al 0,02 %) a un caudal de 0,25 ml/min. Se cargaron 6 µg de GALNS purificada (por 200 µl) en la columna de receptor de M6P a un caudal de 0,1 ml/min. Se retiró mediante lavado la GALNS sin unir de la columna con 10 VC de EQ a un caudal de 0,25 ml/min. Se eluyó la GALNS unida de la columna usando un gradiente de tampón de elución del 0 al 100 % (EL, PBS ácido, pH 6,0 que contenía β-glicerofosfato 5 mM, Tween 20 al 0,05 %, manosa-6-fosfato 5 mM y NaN₃ al 0,02 %) (10 VC), seguido

de 2 VC de EL al 100 %. La columna se volvió a equilibrar con 3 VC de EQ.

Usando un ELISA de GALNS, el porcentaje de GALNS purificada que se unió al receptor de M6P resultó ser del 56 %.

- 5 *Análisis total de oligosacáridos mediante electroforesis capilar (CE).* Para determinar el nivel de manosa-6-fosforilación en GALNS, se determinó el perfil de hidratos de carbono ligados a N de los oligosacáridos totales en la GALNS mediante electroforesis capilar (CE) como se describe en Ma *et al.*, *Anal. Chem.* 71(22): 5185-5192, 1999. El método usó PNGasa F para escindir los oligosacáridos ligados en N asparagina. Los oligosacáridos escindidos se aislaron y se derivatizaron con colorante fluorescente, y se aplicaron a una columna de centrifugación G10 para eliminar el exceso de colorante. Los oligosacáridos purificados, marcados con fluorescencia, se separaron mediante electroforesis, y después se cuantificaron los picos usando el software MDQ-CE (32 Karat Ver. 70.0).

- 15 Usando este ensayo, las cantidades de oligosacáridos que contenían manosa 7 bis-fosforilada (BPM7), manosa 6 mono-fosforilada (MPM6) y ácido siálico para la GALNS purificada eran de 0,58 mol/mol de enzima, 0,08 mol/mol de enzima y no detectable, respectivamente. El porcentaje de proteínas GALNS que contienen BPM7 se estimó en un 29 %.

- 20 *Caracterización de oligosacáridos Bis7.* Se determinó la ubicación de los oligosacáridos de manosa 7 bis-fosforilada (BPM7) en la GALNS. El resto de asparagina (Asn) de la posición 178 estaba glicosilado ligado a N a BPM7. El resto Asn de la posición 397 no estaba glicosilado ligado a N a BPM7, pero resultó ser azúcares de tipo predominantemente oligomanosa.

- 25 *Hidroxiapatita de afinidad.* Se desarrolló un modelo de hueso *in vitro* para determinar si la GALNS tenía la capacidad de dirigirse al hueso. Se preparó una suspensión de hidroxiapatita de grado HTP-ADN a 4 mg/ml (Bio-RAD) y se equilibró en DBS + 50 µg/ml de BSA, pH 7,4. La GALNS purificada, después de la adición de 50 µg/ml de BSA, se desaló en DBS, pH 7,4. La GALNS desalada, a una concentración final de aproximadamente 2 mg/ml, se diluyó en serie en DBS + 50 µg/ml de BSA, pH 7,4 en una placa de 96 pocillos. Se transfirieron 50 µl de la GALNS diluida en serie a placas con filtro de 96 pocillos (Millipore n.º MSGVN2210, PVDF hidrófilo, baja unión a proteínas, 22 µm de tamaño de poro). Se añadieron 50 µl de la suspensión de hidroxiapatita a los pocillos de la placa de filtro que contenía la GALNS diluida en serie y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación suave. La placa se sometió a filtración al vacío.

- 30 Los sobrenadantes del filtro de vacío se analizaron mediante bien HPLC o la actividad de la enzima GALNS como se ha descrito anteriormente. La GALNS purificada resultó tener una Kd de hidroxiapatita de 3-4,0 µM.

- 35 La línea celular G71S que expresa el factor modificar de la sulfatasa 1 (SUMF1) humano produce enzimas sulfatasas lisosomales con mayores cantidades de activación (es decir, la conversión del resto de cisteína del sitio activo en C_α-formilglicina (FGly)).

- 40 Para determinar si la enzima sulfatasa lisosomal recombinante purificada (por ejemplo, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana) expresada junto con SUMF1 en las células G71S presenta un aumento de la activación, se determinó la cantidad de conversión del resto de cisteína del sitio activo en FGly de la enzima sulfatasa lisosomal purificada.

- 45 *Actividad de GALNS.* Se determinó el porcentaje de activación, es decir, el porcentaje de conversión del resto de cisteína del sitio activo (Cys) en C_α-formilglicina (FGly), de la GALNS mediante LC/MS (TFA). El TIC/1000 para Cys, FGly y Gly resultaron ser 39, 1.840 y 183, respectivamente, lo que indica que aproximadamente el 90 % de la GALNS purificada está en una forma activa (es decir, FGly).

- 50 *Resumen.* La Tabla 7 muestra un resumen de la caracterización de la GALNS recombinante expresada en células del clon 4 de G71S. La Tabla 8 muestra un resumen de la caracterización de GALNS recombinante expresada en células de clon C2 de G71S.

Tabla 7: Caracterización de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana producida del clon 4 de G71S

Categoría del ensayo	GALNS
Actividad específica: Actividad/Antígeno por ELISA	0,165 U/mg
Actividad específica: Actividad/Proteína	7,7 U/mg
Pureza medida por C4-RP	> 95 % (6 lotes analizados)
Tamaño medido por SEC	115 kDa (homodímero)
Estabilidad en suero a 37 °C	217 horas
Absorción: Condrocitos	4,9 nM
Absorción: Fibroblastos	5,0 nM

Categoría del ensayo	GALNS
Absorción: Osteoblastos	7,8 nM
Productividad	1,3 pg/célula/día
Título	4,2 mg/l
Unión a la placa del receptor de M6P	2,4 nM
Unión a la columna del receptor de M6P: % unido	56 %
Contenido de M6P medido por CE: % hidratos de carbono totales	29 %
Contenido de M6P: moles de M6P/moles de GALNS	0,58
Contenido de ácido siálico medido por CE	1 %
Afinidad de hidroxipatito	4 μ M
Activación: % de FGly	90 %

Tabla 8: Caracterización de N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana producida del clon C2 de G71S

Categoría del ensayo	GALNS
Actividad específica: Actividad/Proteína	6,4 U/mg
Pureza medida por C4-RP	97 %
Tamaño medido por SEC	115 kDa (homodímero)
Absorción: Fibroblastos	3,4 nM
Título	6,4 mg/l (4 lotes analizados)
Unión a la placa del receptor de M6P	5,7 nM
Contenido de M6P medido por CE: % de hidratos de carbono totales	34,5 %
Contenido de M6P: moles de M6P/moles de GALNS	0,69

5 Estos resultados demuestran que la GALNS humana recombinante purificada tiene un alto nivel de activación, y altos niveles de fosforilación de manosa 6-fosfato. Así pues, las células G71S que expresan conjuntamente SUMF1 y una enzima sulfatasa lisosomal (es decir, GALNS) producen eficientemente enzima sulfatasa lisosomal altamente fosforilada activa. El aumento del nivel de restos de alto contenido de manosa sobre dichas enzimas sulfatasas lisosomales conduce a un aumento de la absorción por MPR en las células.

10

EJEMPLO VII

ABSORCIÓN Y ACTIVIDAD DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA RECOMBINANTE EN CONDROCITOS DE MORQUIO *IN VITRO*

15

Se evaluó la absorción de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante por los lisosomas de condrocitos de Morquio y la capacidad de GALNS para degradar el queratán sulfato (KS) *in vitro*.

20

Los condrocitos de pacientes con mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa, Síndrome de Morquio) tienen una actividad de GALNS reducida y presentan la acumulación lisosomal de KS. Se estableció un modelo *in vitro* de MPS IVa usando condrocitos aislados de biopsias de la cresta ilíaca de un paciente con MPS IVa. Los condrocitos primarios, sin embargo, se desdiferencian y pierden sus características de condrocitos en cultivo. Por lo tanto, se establecieron las condiciones de cultivo para inducir la diferenciación de los condrocitos *in vitro*.

25

Se cultivaron condrocitos aislados de un paciente con MPS IVa, designados MQCH, en perlas de alginato en presencia de IGF-1, TGF- β , transferrina, insulina y ácido ascórbico (medio de crecimiento de condrocitos, Lonza n.º CC-3225). Se cambió el medio de cultivo dos veces a la semana durante los experimentos, de 6 a 15 semanas. Estas condiciones de cultivo indujeron la expresión del fenotipo y la diferenciación de los condrocitos. Estas células MQCH expresaron marcadores de condrocitos, incluyendo la región determinante del sexo Y-box 9 (Sox 9), colágeno II, colágeno X, proteína de la matriz oligomérica del cartílago y ARNm de aggrecan, de acuerdo con lo medido mediante análisis de RT-PCR cuantitativa usando ARN aislado de cultivos de células MQCH. Estas células MQCH cultivadas también elaboraron la matriz extracelular.

30

35

Se realizó una microscopía confocal para confirmar que las células MQCH acumulan KS. Se trataron células MQCH de un cultivo de 8 semanas con tripsina, se citocentrifugaron en portaobjetos de vidrio, se fijaron en acetona y se congelaron hasta su uso. Después de la descongelación, se rehidrataron las células y se tiñeron usando, como anticuerpos primarios y secundarios, un anticuerpo monoclonal anti-KS (Chemicon) y un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa-488 (verde), respectivamente. Las células MQ-CH mostraron tinción intracelular punteada, en consonancia con la acumulación lisosomal de KS.

40

Para determinar si la GALNS humana recombinante purificada podría ser captada por las células MQCH en los lisosomas y degradar el KS, se incubó un cultivo de células MQCH de 6 semanas con GALNS humana recombinante 10 nM dos veces a la semana durante 9 semanas. Se midieron la absorción de GALNS y la depuración de KS mediante microscopía confocal. Los anticuerpos primarios usados fueron: (a) un anticuerpo policlonal de conejo anti-GALNS y un anticuerpo monoclonal de proteína-1 de membrana asociada anti-lisosomal (LAMP-1) o (b) un anticuerpo monoclonal anti-KS y un anticuerpo policlonal anti-LAMP-1. Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpos conjugados con Alexa-488 (verde) para detectar anticuerpos anti-GALNS o anti-KS, o anticuerpos conjugados con Alexa-555 o -594 (rojo) para la detección de anticuerpos anti-LAMP-1. Se montaron preparados de células MQCH en medio de montaje que contenía DAPI, que tiñe los núcleos.

Se observó una ubicación conjunta significativa de la enzima GALNS y KS con el marcador lisosomal, LAMP-1 en las células MQCH tratadas con GALNS. Tras la exposición de MQCH a GALNS humana recombinante, se disminuyó la cantidad de KS intracelular.

También se midió la absorción de GALNS usando un ELISA de captura de enzima GALNS y un ELISA de la actividad específica de GALNS, ambos descritos en el Ejemplo IV anterior. Los condrocitos humanos normales (NHKC), que expresan GALNS, se usaron como control positivo. Como se muestra en las Tablas 9 y 10, las células MQCH no tratadas no tuvieron enzima ni actividad GALNS detectables, mientras que las células MQCH tratadas durante 9 semanas con GALNS 10 nM tuvieron enzima y actividad GALNS significativas.

Tabla 9: ELISA de captura de enzima GALNS usando células MQCH

	Células MQCH	NHKC
Sin tratamiento	N.D. ^a	0,12 ^b
GALNS 10 nM durante 9 semanas	3,99	0,88
^a No detectadas; ^b ng de antígeno de GALNS/μg de proteína total		

Tabla 10: Ensayo de la actividad específica de GALNS usando células MQCH

	Células MQCH	NHKC
Sin tratamiento	N.D. ^a	2,76 ^b
GALNS 10 nM durante 9 semanas	3,68	5,15
^a No detectadas; actividad de GALNS/ng de antígeno		

Estos resultados demuestran que la GALNS humana recombinante purificada es absorbida por los condrocitos de Morquio en los lisosomas y puede degradar el KS lisosomal *in vitro*. Estos condrocitos de Morquio son útiles como un modelo de eficacia *in vitro* para analizar las enzimas sulfatasas lisosomales, tales como GALNS, que degradan el KS.

EJEMPLO VIII

ACTIVIDAD DE ENZIMAS LISOSOMALES HUMANAS RECOMBINANTES PARA DEGRADAR SUSTRATOS NATURALES EN UN ENSAYO BASADO EN CÉLULAS *IN VITRO*

Se desarrollaron ensayos *in vitro* basados en células para medir la actividad de las enzimas lisosomales recombinantes humanas, por ejemplo, enzimas sulfatasas lisosomales, para degradar los sustratos naturales.

La actividad enzimática de las enzimas lisosomales humanas recombinantes, por ejemplo, de las enzimas sulfatasas lisosomales, normalmente se mide mediante un ensayo *in vitro* exento de células usando un sustrato fluorogénico artificial (véase el Ejemplo 4 para GALNS). Sin embargo, la actividad de la enzima medida es dependiente del tamaño del sustrato artificial, es decir, del número de unidades de monosacáridos. Además, la actividad de la enzima se mide en un entorno que no es un reflejo de la situación *in vivo*. Por lo tanto, el ensayo *in vitro* exento de células no tiene en cuenta la capacidad de la enzima lisosomal para escindir sustratos naturales ni su capacidad para ser captada en las células diana y localizada en los lisosomas.

Se desarrolló un ensayo *in vitro* basado en células para medir la actividad de dos enzimas lisosomales humanas recombinantes, la alfa-L-iduronidasa (UDI) y la arilsulfatasa B (ARSB), para degradar sus sustratos naturales, es decir, sustratos que contienen sulfato de dermatán (DS) intracelular. El DS contiene de forma variable unidades de disacárido de ácido idurónico sulfatado β (1-3) y N-acetil-galactosamina β (1-4).

Se cultivaron células de fibroblastos humanos GM00519 deficientes en ARSB o células de fibroblastos humanos GM01391 deficientes en IDU hasta la confluencia en placas de 12 pocillos, y los cultivos se mantuvieron después de la confluencia durante 3-6 semanas para permitir la acumulación de DS intracelular.

A continuación, se expusieron las células GM00519 y GM01391 tras la confluencia a dosis de saturación de ARSB humana recombinante (10 nM) o IDU humana recombinante (25 nM), respectivamente, durante 4-5 días. Se recogieron las células tratadas con enzimas sulfatasas lisosomales y las células sin tratar, se lisaron y se centrifugaron.

Se midió la actividad de la enzima lisosomal en los lisados celulares mediante la determinación del contenido de DS residual de las células mediante: (1) lisis de las células; (2) digestión específica de sustratos que contienen DS en disacáridos usando condroitina ABC liasa (EC 4.2.2.4) en el lisado celular; (3) marcaje de disacáridos de DS con un colorante fluorescente (por ejemplo, 2-amino-acridona, AMAC); (4) separación de los disacáridos de DS (por ejemplo, mediante electroforesis de zona capilar, CZE); y (5) detección de los disacáridos de DS marcados (por ejemplo, mediante fluorescencia inducida por láser, LIF). Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Zinellu *et al.*, "Electrophoresis" 2:2439-2447, 2007, y Lamari *et al.*, *J. Chromatogr. B* 730:129-133, 1999 (revisado en Volpi *et al.*, "Electrophoresis" 29:3095-3106, 2008).

La Tabla 11 muestra el porcentaje de degradación de DS usando células GM00519 tratadas con ARSB, determinado mediante la medición de la cantidad de disacárido que contiene N-acetilgalactosamina-4-sulfato (disacárido 4S), que es el disacárido de DS predominante. Se obtuvieron resultados similares usando células GM01391 tratadas con IDU.

Tabla 11: Agotamiento de DS por ARSB en un ensayo *in vitro* basado en células

Edad de las células (semanas)	Células GM00519 (% de degradación) ^a
3	86
4	92
5	92
6	89
^a El porcentaje de degradación se calculó midiendo la superficie bajo la curva del disacárido 4S detectado en la exploración de CZE-LIF en lisados de células tratadas con ARSB en comparación con células sin tratar	

El ensayo anterior indicó que las células diana captan ARSB e IDU humanas recombinantes, que luego se ubican en los lisosomas, donde degradan su sustrato natural, el DS intracelular.

Se realizó un experimento de búsqueda de la dosis para determinar la concentración a la que IDU se vuelve limitante de la velocidad en este ensayo basado en células. Se cultivaron células GM01391 en placas de 12 pocillos. A las 4 semanas de la confluencia, se expusieron las células a diversas concentraciones de IDU, de 0,8 nM a 25 nM, durante 6 o 26 horas. Se prepararon lisados celulares y se procesaron como se ha descrito anteriormente. Se determinó que IDU no se volvió limitante de la velocidad por debajo de 1 nM.

En un segundo experimento de búsqueda de la dosis, se expusieron las células GM01391 a las 3 semanas de la confluencia a diversas concentraciones de IDU, de 0,01 a 0,2 nM, durante 2 días. Se prepararon lisados celulares y se procesaron como se ha descrito anteriormente. En este experimento, se añadió una cantidad conocida de un monosacárido patrón interno, GlcNAc-6S, a los lisados celulares para controlar la recuperación durante el procesamiento. Como se muestra en la Figura 11, se observó una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato de DS en las células GM01391 tratadas con IDU.

En un experimento de búsqueda de dosis similar, se expusieron las células GM01391 a las 3 semanas de la confluencia a diversas concentraciones de ARSB, de 0,001 a 0,06 nM, durante 5 días. Se prepararon lisados celulares y se procesaron como se ha descrito anteriormente. En este experimento, se añadió una cantidad conocida de un monosacárido patrón interno, GlcNAc-6S, a los lisados celulares para controlar la recuperación durante el procesamiento. Como se muestra en la Figura 12, se observó una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de sustrato de DS en las células GM01391 tratadas con ARSB.

Se desarrolló un ensayo *in vitro* basado en células para medir la actividad de una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante, la GALNS, para degradar su sustrato natural, es decir, sustratos que contienen queratán sulfato (KS) intracelular.

Se cultivaron células MQCH deficientes en GALNS como se describe en el Ejemplo 7 anterior y se trataron con GALNS humana recombinante a 1 o 10 nM. Después del tratamiento, se prepararon lisados de células MQCH y se digirieron con queratanasa II (EC 3.2.1), que descompone oligosacáridos de KS más grandes en disacáridos de KS. Se marcaron los disacáridos de KS con AMAC, se separaron mediante CZE y se detectaron mediante LIF, como se ha descrito anteriormente para los disacáridos de DS. Se añadió GlcNAc 6S, un monosacárido de KS, a los lisados celulares como patrón interno para el control de la recuperación durante el procesamiento. Se midieron las cantidades de dos disacáridos de KS característicos, Gal6S-GlcNAc6S y Gal-GlcNAc6S, y los datos obtenidos se recogieron mediante la cantidad de GlcNAc6S recuperada. La Tabla 12 muestra el porcentaje de degradación de KS usando células MQCH tratadas con GALNS, como se determina mediante la medición de la cantidad de los dos disacáridos de KS característicos.

Tabla 12: Agotamiento de KS por GALNS en un ensayo *in vitro* basado en células

	Gal6S-GlcNAc6S	Gal-GlcNAc6S
GALNS 1 nM	85,7 ^a	78,5 ^b
GALNS 10 nM	88,6	81,5

^{a,b}Se calculó el porcentaje de degradación midiendo el área bajo la curva de Gal6S-GlcNAc6S y Gal-GlcNAc6S detectados en la exploración de CZE-LIF en lisados de células MQCH tratadas con GALNS en comparación con las células sin tratar, y ajustando para el área bajo la curva del control de GlcNAc6S añadido.

El ensayo anterior indicó que las células diana captan la GALNS humana recombinante, que después se ubica en los lisosomas, donde GALNS degradado su sustrato natural, el KS intracelular.

- 5 En general, estos resultados demostraron que la actividad de las enzimas lisosomales humanas recombinantes, ARSB, IDU y GALNS, para degradar sus sustratos naturales se puede medir y cuantificar en ensayos *in vitro* basados en células. Se debe apreciar que este ensayo *in vitro* basado en células se puede modificar fácilmente para medir y cuantificar la actividad de otras enzimas sulfatasas lisosomales, así como una amplia variedad de enzimas lisosomales recombinantes.

10 EJEMPLO IX

SUMINISTRO DE N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA RECOMBINANTE A TEJIDOS ESPECÍFICOS

- 15 Se evaluó la capacidad de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante, expresada en células G71 y purificada, para su suministro a tejidos específicos afectados por, o asociados con, la deficiencia de GALNS sobre su administración en ratones.

- 20 La distribución altamente específica del queratán sulfato da el fenotipo muy característico de la Mucopolisacaridosis de tipo IVA (MPS IVA) o síndrome de Morquio. El queratán sulfato se encuentra principalmente en el cartílago (placas de crecimiento óseo de las articulaciones, la válvula cardíaca, la laringe y el tabique nasal) y la córnea, y son estos los tejidos que presentan la acumulación de queratán sulfato en pacientes de MPS IVA. Así pues, para la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), que es deficiente en MPS IVA o síndrome de Morquio, es importante mostrar el suministro de la enzima GALNS a la placa de crecimiento de los huesos largos, la válvula cardíaca, la córnea, la laringe y la nariz. Para observar estos tejidos específicos, que son dianas poco vascularizadas, se examinó el suministro de una GALNS fluorescente en ratones.

- 30 Se ensayaron dos métodos de tinción inmunohistoquímica en ratones: (1) GALNS humana conjugada con Alexa 488 y (2) GALNS humana no conjugada. La conjugación de GALNS humana con Alexa 488 se realizó usando el kit de marcaje de maleimida Fluor 488 C₅ de Molecular Probes (A-10254). La química de conjugación de maleimida dio lugar a una proporción de marcador con respecto a proteína de 1:1.

- 35 Para confirmar que el marcador fluorescente no interfería con la absorción de GALNS, se realizó un experimento de inmunocitoquímica usando sinoviocitos cultivados (ATCC n° CRL-1832). Se utilizó un ensayo de absorción convencional para comparar la GALNS no conjugada con la GALNS conjugada (GALNS-A488 o GALNS-A555). Las células se incubaron con la enzima de GALNS durante 4 horas con una persecución posterior con α -L-iduronidasa (IDU) durante 2 horas. Los resultados mostraron que la conjugación de Alexa 488 no interfirió con la absorción celular. La Figura 13 muestra la Kd estimada para GALNS, GALNS-A488 y GALNS-A555. La absorción se midió mediante ELISA de antígeno del lisado celular en lugar de la actividad enzimática, debido a que el marcaje inactivó la enzima. La Kd de las enzimas GALNS no conjugadas y conjugadas resultó ser aproximadamente igual.

- 45 Para determinar la estabilidad del marcador fluorescente, una vez que se incorporó la enzima GALNS en la célula, se realizó la inmunotinción en GALNS no conjugado y conjugado. El anticuerpo primario usado para la tinción era un anticuerpo de conejo anti-GALNS purificado con proteína G a una concentración de 1 μ g/ml. Todas las imágenes se tomaron en un microscopio de epi-fluorescencia de campo ancho Leica IRE2 usando el software MetaMorph. Se requería la deconvolución de las pilas de imágenes para medir la ubicación conjunta en estas imágenes debida a la presencia de la luz fuera del plano. La deconvolución se realizó usando el software de visualización AutoQuant/AutoDeblur usando una función de dispersión puntual teórica (algoritmo ciego).

- 50 La inmunotinción mostró bastante buena superposición con la señal que se amplificó sobre el material de GALNS-A488. El aumento observado en la sensibilidad se debió al anticuerpo primario y secundario, siendo ambos policlonales.

- 55 Para determinar si la enzima GALNS se había dirigido a los lisosomas, se realizó la inmunotinción de los sinoviocitos cultivados con Lysotracker de Molecular Probes u otra enzima que se localiza en el lisosoma. El LysoTracker pareció mostrar cierta superposición con la enzima GALNS-488; sin embargo, la tinción no fue uniforme. Una persecución de 2 horas con N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa humana recombinante (rhASB), una enzima lisosomal, mostró cierta localización junto con GALNS.

Los experimentos anteriores demostraron que la enzima GALNS-A488 es captada por las células y se ubica en el lisosoma, y se puede usar para determinar la biodistribución *in vivo*.

Se realizaron dos estudios *in vivo*. Un primer estudio piloto fue una inyección de bolo de una sola dosis (10 mg/kg) en la vena de la cola de ratones Balb/c normales, seguida de un segundo estudio con múltiples (5) inyecciones cada dos días de 10 mg/kg en la vena de la cola de los ratones Balb/c normales. La Tabla 13 y la Tabla 14 describen los planes experimentales para el primer y segundo estudio, respectivamente.

Tabla 13: Diseño experimental del primer estudio piloto

Grupo	Total	Punto de tiempo de 2 h	Punto de tiempo de 24 h
Control de PBS	4	2	2
GALNS-A488	4	2	2
GALNS sin marcar	4	2	2
ASB sin marcar	1	1	0

Tabla 14: Diseño experimental del segundo estudio

Grupo	Total	Punto de tiempo de 2 h	Punto de tiempo de 4 h	Punto de tiempo de 8 h
Control de PBS	2	1	0	1
Control de PBS/Cys	4	2	0	2
GALNS-A488	9	3	3	3
GALNS sin marcar	6	3	0	3
ASB sin marcar	3	2	0	1

En el primer estudio piloto, se lo recogieron el corazón, el hígado y la articulación de la tibia/fémur en los puntos de tiempo de 2 horas y 24 horas. En el segundo estudio, se lo recogieron el corazón, el riñón, el hígado y el hueso con cuádriceps y soleo en los puntos de tiempo de 2 horas, 4 horas y 8 horas. Para ambos estudios, se fijaron por inmersión el corazón, el riñón y el hígado en paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 4 días, se embebieron en parafina y luego se seccionaron a un espesor de 7 μ m. El hueso, incluyendo el músculo en el segundo estudio, se fijó por inmersión en PFA al 4 % durante 8 días, se descalcificó, se embebió en parafina y se seccionó a un espesor de 7 μ m.

Se adquirieron imágenes de ratones inyectados con GALNS-A488 en un microscopio confocal de barrido láser de Zeiss. Para el análisis en el primer estudio piloto, se adquirió una pila confocal por muestra para la válvula cardíaca y el hígado y se usó para el análisis volumétrico. Se adquirieron dos pilas confocales/muestra para la placa de crecimiento y se usaron para el análisis volumétrico. En el segundo estudio, se adquirió una pila confocal/muestra para la válvula cardíaca, riñón e hígado, y se usó para el análisis volumétrico; se adquirieron dos pilas confocales/muestra para la placa de crecimiento y la zona de descanso del cartílago (zrc), y se usaron para el análisis volumétrico.

Las conclusiones de los estudios de formación de imágenes de microscopía confocal fueron: (1) que fue posible detectar GALNS fluorescente *in vivo*; (2) que la señal era específica (ausencia de fondo) y la localización fue lisosomal; (3) que se demostró la presencia de GALNS en la célula sinusoidal del hígado; (5) en el corazón, la enzima GALNS estaba presente en el septo y en la aurícula, pero lo más destacable es que era claramente visible a nivel de la válvula cardíaca, en la que se distribuye más profundamente después de múltiples inyecciones; (6) en la articulación de fémur/tibia, la enzima GALNS estaba presente en la parte mineralizada del hueso (epífisis), así como en la médula ósea. La GALNS estaba presente en la placa de crecimiento. Más particularmente, la GALNS era abundante en los condrocitos de la zona de descanso (o de la zona de cartílago inverso), presente en el comienzo de la zona proliferativa, y reapareció abundantemente en la zona de osificación en el extremo de la placa de crecimiento. Aunque es difícil cuantificar el efecto acumulativo de múltiples inyecciones, el segundo estudio parecía mostrar una distribución más amplia. La Tabla 15 muestra un resumen de los estudios de formación de imágenes de microscopía confocal.

Tabla 15: Biodistribución de GALNS en ratones

Tejido	Localización
Hueso (Fémur)	
Región mineralizada	Sí
Médula ósea	Sí
Placa de crecimiento	Sí
Corazón	
Válvula cardíaca	Sí
Aurícula	Sí
Septo	Sí
Hígado	
Hepatocito	No

Tejido	Localización
Célula sinusoidal	Sí

Para la tinción secundaria, la etapa inicial fue la optimización del anticuerpo primario GALNS. Se tiñeron diversos tejidos con diluciones de 1:100 a 1:400 con el anticuerpo de conejo anti-GALNS purificado con proteína G. Los resultados del primer estudio piloto indicaron que una dilución de 1:100 era óptima para una alta relación de señal a ruido. Este resultado se confirmó en el segundo estudio. El resto de portaobjetos se procesó a una dilución de anticuerpo primario de 1:100 y una dilución de anticuerpo secundario de 1:1000.

La señal para los ratones Balb/c a los que se administraron GALNS tenía una señal por encima del control (es decir, ratones que recibieron PBS-Cys) cuando se tiñó con el anticuerpo anti-GALNS purificado con proteína G. Para confirmar que la enzima GALNS se encontraba en el lisosoma, se tiñeron los cortes con un anticuerpo anti-LAMP1. LAMP1 es un marcador de lisosomas. Las imágenes mostraron superposición entre los anticuerpos anti-GALNS y anti-LAMP1, lo que indica que la enzima GALNS se encuentra en el lisosoma.

En general, los dos estudios *in vivo* indican que la biodistribución de GALNS está vinculada a la vascularización, es decir, los tejidos más vascularizados contienen señal más fluorescente. Más importante aún, los estudios demuestran la presencia de GALNS en los sitios de acumulación de queratán sulfato en el síndrome de Morquio, incluso si estos sitios están poco vascularizados.

EJEMPLO X

EFFECTOS DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA RECOMBINANTE Y OTRAS ENZIMAS SULFATASAS LISOSOMALES EN RATONES DEFICIENTES EN ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SULFATASA LISOSOMAL

Se evalúan los efectos de las enzimas sulfatasas lisosomales humanas altamente fosforiladas activas de la invención, por ejemplo, la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante en ratones deficientes en actividad de la enzima sulfatasa lisosomal.

Se expresa la proteína GALNS humana recombinante en células G71S y se purifica. Otras enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes puede expresarse y purificarse básicamente de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento o mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Se han descrito diversos modelos de ratón de deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal humana, incluyendo: Leucodistrofia metacromática (MLD) (deficiencia en arilsulfatasa A), (Hess *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:14821-14826, 1996), mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) o síndrome de Maroteaux-Lamy (deficiencia en arilsulfatasa B) (Evers *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:8214-8219, 1996), mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter (deficiencia en iduronato-2-sulfatasa) (Muenzer *et al.*, *Acta Paediatr. Supl.* 91(439):98-99, 2002; Cardone *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 15:1225-1236, 2006), mucopolisacaridosis de tipo IIIa (MPS IIIa) o síndrome de Sanfilippo A (deficiencia en sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa) (Bhaumik *et al.*, *Glycobiology* 9(12): 1389-1396, 1999), mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A (deficiencia en N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa) (Tomatsu *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 12:3349-3358, 2003), y deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD) (deficiencia del factor de modificación 1 de sulfatasas) (Settembre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104:4506-4511, 2007).

Los modelos de ratón de la deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal humana se pueden usar para evaluar la viabilidad de la terapia de reemplazo de enzimas (ERT) como un medio para el tratamiento de los trastornos por depósito lisosomal. Por ejemplo, los ratones desactivados para MPS IV (ratones GALNS^{-/-}; Tomatsu *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 12:3349-3358, 2003) no tienen actividad de la enzima GALNS detectable y muestran un aumento de los glicosaminoglicanos (GAG) urinarios, es decir, sulfato de queratina y condroitina-6-sulfato, y la acumulación de GAG en múltiples tejidos y órganos, por ejemplo, hígado, riñón, bazo, corazón, cerebro, médula ósea y cartílago. Sin embargo, los ratones GALNS^{-/-} no mostraron anomalías esqueléticas asociadas a la enfermedad humana. Se desarrolló otro modelo de MPS IVa de ratón que expresa un GALNS humana inactiva y una GALNS de ratón endógena inactiva, mutada (ratones GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu}; Tomatsu *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 14:3321-3335, 2005). En ratones GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu}, que no tienen actividad de enzima GALNS detectable, se aumenta la excreción urinaria de GAG, las GAG se acumulan en varios tejidos, incluyendo los órganos viscerales, el cerebro, la córnea, el hueso, el ligamento y la médula ósea, el almacenamiento lisosomal es notable en múltiples tejidos, y el almacenamiento óseo es evidente. Las alteraciones patológicas en ratones GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu} son diferentes a las observadas en los ratones GALNS^{-/-}. Sin embargo, al igual que los ratones GALNS^{-/-}, los ratones GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu} no presentan anomalías esqueléticas asociadas a la enfermedad humana. Por lo tanto los ratones GALNS^{-/-} o GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu} se pueden usar para examinar el efecto de la administración de GALNS humana recombinante en el aumento de las GAG urinarias y la acumulación de las GAG en los tejidos.

Se aplican a ratones GALNS^{-/-}, GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu} o de tipo silvestre inyecciones intravenosas semanales (n = al menos 6 u 8 por grupo) de diversas dosis de GALNS humana recombinante (por ejemplo, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 mg/kg) o un vehículo de control a lo largo de 16-20 semanas de vida, y después se sacrifican para el examen histológico. Se recoge

la orina de los ratones y se determina la excreción de GAG urinaria como se describe (Tomatsu *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 12:3349-3358, 2003). Se realiza el examen patológico de diversos tejidos como se describe (Tomatsu *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 12:3349-3358, 2003).

- 5 Usando los ratones GALNS^{-/-} o GALNS^{tm(h79S.mC76S)slu}, se espera que la GALNS humana recombinante de la invención demuestre la capacidad de reducir: (1) la excreción de GAG urinaria, (2) la acumulación de las GAG en múltiples tejidos, por ejemplo, órganos viscerales, cerebro, córnea, hueso, ligamento y médula ósea; (3) almacenamiento lisosomal en múltiples tejidos, y (4) almacenamiento óseo.
- 10 Se examinó el efecto de GALNS humana recombinante en un modelo de ratón de deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD) (ratones *SUMF1*^{-/-}; Settembre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104:4506-4511, 2007). Debido a que los ratones *SUMF1*^{-/-} muestran mortalidad frecuente a poca edad, las inyecciones de estos ratones con GALNS humana recombinante se inician antes que las descritas anteriormente para los ratones GALNS^{-/-}.
- 15 Siguiendo los procedimientos conocidos en la técnica, se examinaron los efectos de otras enzimas sulfatasas lisosomales humanas recombinantes, es decir, la arilsulfatasa A, arilsulfatasa B, iduronato-2-sulfatasa, sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa y N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, en modelos de ratón de MLD (ratones *ASA*^{-/-}; Hess *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:14821-14826, 1996), MPS VI (ratones *As1-s*^{-/-}; Evers *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:8214-8219, 1996), MPS II (ratones *ids*^{+/+}; Cardone *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 15:1225-1236, 2006), MPS IIIa (Bhaumik *et al.*, *Glycobiology* 9(12):1389-1396, 1999) y MSD (ratones *SUMF1*^{-/-}; Settembre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104:4506-4511, 2007).

EJEMPLO XI

- 25 TRATAMIENTO DE PACIENTES HUMANOS CON MUCOPOLISACARIDOSIS DE TIPO IVA (O SÍNDROME DE MORQUIO) U OTRAS DEFICIENCIAS DE ENZIMAS SULFATASAS LISOSOMALES CON N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA RECOMBINANTE Y OTRAS ENZIMAS SULFATASAS LISOSOMALES

- 30 Los pacientes humanos que manifiestan un fenotipo clínico de deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal, tales como los pacientes con diagnóstico de mucopolisacaridosis de tipo IVA (MPS IVa o síndrome de Morquio), se contemplan para la terapia de sustitución enzimática con la enzima recombinante, es decir, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana. Todos los pacientes que padecen una deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal manifiestan cierta evidencia clínica de acumulación en el tejido visceral y suave excesiva o perjudicial del material de almacenamiento en sus lisosomas como se manifiesta mediante diferentes grados de deterioro funcional o empeoramiento del estado de salud asociado con una enfermedad por depósito lisosomal en particular. Todos los pacientes de MPS IV manifiestan cierta evidencia clínica de deformidad ósea, baja estatura y trastornos de la marcha, y/o acumulación de glicosaminoglicano (GAG) en la sangre o en la orina, con distintos grados de deterioro funcional.

- 40 Preferentemente, los niveles de enzimas se controlan en un paciente que padece una deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal para confirmar la ausencia o la reducción de la actividad de la enzima sulfatasa lisosomal en sus tejidos. Los pacientes con menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, más preferentemente menos del 2 % y aún más preferentemente menos del 1 % de la actividad de la enzima lisosomal en un sujeto normal por lo demás son candidatos adecuados para el tratamiento con la enzima sulfatasa lisosomal apropiada. Se pueden recoger datos para determinar la actividad de la enzima sulfatasa lisosomal del paciente antes, durante y después de la terapia.

- 50 La eficacia se determina midiendo el porcentaje de reducción en la excreción urinaria del sustrato, es decir, de glicosaminoglicano (GAG) de la enzima sulfatasa lisosomal en el tiempo. Los niveles de GAG en orina en pacientes que padecen una deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal se comparan con los niveles de excreción normales y/o los niveles en los pacientes no tratados padecen la misma deficiencia de la enzima sulfatasa lisosomal y/o los niveles en el mismo paciente antes de la terapia con la enzima sulfatasa lisosomal. Una reducción superior al 25 %, preferentemente una reducción superior al 50 %, en la excreción de los GAG no degradados después de la terapia con la enzima sulfatasa lisosomal es un medio válido para medir la respuesta de un individuo a la terapia.

- 55 La eficacia también se puede determinar de acuerdo con los signos y síntomas reducidos de la patología asociada con la enfermedad por depósito lisosomal. La eficacia se puede determinar mediante biopsia de tejido y el examen de las células y/o los lisosomas para determinar el grado en el que se han reducido los GAG en los lisosomas, las células o los tejidos. La eficacia se puede determinar mediante evaluaciones funcionales, que pueden ser objetivas o subjetivas (por ejemplo, la reducción del dolor o la dificultad en la función, el aumento de la fuerza muscular o la resistencia, el aumento del gasto cardíaco, la resistencia al ejercicio, los cambios en la masa corporal, la altura o el aspecto, y similares).

- 60 Una composición farmacéutica que comprende GALNS humana recombinante, expresada en células G71S y purificada, y formulada de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Se prefiere administrar las composiciones farmacéuticas de la invención por vía intravenosa.

- 65 El diseño básico de un estudio clínico inicial para investigar el efecto de la administración de GALNS humana

recombinante a pacientes de MPS IVa implica un estudio de seguridad/eficacia sin enmascaramiento y con aumento escalonado de la dosis, en el que se administran diversas dosis de enzima por vía intravenosa a los pacientes en un intervalo fijo, por ejemplo, y sin limitación, inyecciones de enzima semanales.

- 5 Para los pacientes de MPS IVa, la eficacia se determina midiendo, por ejemplo, la disminución de GAG en sangre u orina, que es probable que se observe en algunas semanas de la ERT, el aumento de la resistencia en las pruebas de función cardíaca, pulmonar y/o motora, que es probable que se observe en unos meses de la ERT, y/o los cambios esqueléticos y/o el crecimiento corporal, que es probable que se observe en unos años de la ERT.
- 10 Las mediciones de GAG en orina son útiles para el establecimiento de una pauta de dosificación apropiada, así como para la determinación de la eficacia, mediante la medición del porcentaje de reducción en la excreción de GAG urinaria en el tiempo.
- 15 Se puede emplear una variedad de ensayos de resistencia, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, pruebas de la marcha (la distancia recorrida en 6 o 12 minutos), subir escaleras (escaleras por minuto), y la función pulmonar/respiratoria, incluyendo la función cardíaca (ECG, ecocardiograma), la función pulmonar (FVC, FEV₁, flujo máximo).
- 20 Para los pacientes más jóvenes sometidos a tratamiento durante períodos prolongados de tiempo, se puede medir el crecimiento (la altura).
- 25 Las enfermedades por depósito lisosomal asociadas a la deficiencia en la actividad de la enzima sulfatasa lisosomal que se pueden tratar o prevenir usando los métodos de la presente invención son: Leucodistrofia metacromática (MLD), mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) o síndrome de Maroteaux-Lamy, mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis de tipo IIIa (MPS IIIa) o síndrome de Sanfilippo A, mucopolisacaridosis de tipo IIIb (MPS IIIb) o síndrome de Sanfilippo D, mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A o deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD). Para cada enfermedad por depósito lisosomal, la enzima sulfatasa lisosomal recombinante comprendería una enzima sulfatasa lisosomal específica.
- 30 Para los métodos que implican la MLD, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la arilsulfatasa A. Para los métodos que implican la MPS VI, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la arilsulfatasa B. Para los métodos que implican la MPS II, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la iduronato-2-sulfatasa. Para los métodos que implican la MPS IIIA, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la sulfamidasa/heparán-N-sulfatasa. Para los métodos que implican la MPS IIID, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la N-acetilglucosamina-6-sulfatasa. Para los métodos que implican la mucopolisacaridosis IV, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. Para los métodos que implican la MSD, la enzima sulfatasa lisosomal preferida es la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa, que comprende las etapas de:
 - (a) cultivar una célula de grupo de complementación END3 derivada de ovario de hámster chino (CHO) o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal;
 - (b) preparar un primer vector de expresión de mamífero capaz de expresar dicha enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa en dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal;
 - (c) preparar un segundo vector de expresión de mamífero capaz de expresar el factor de modificación 1 de sulfatasa humana recombinante (SUMF1) en dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal;
 - (d) transfectar dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal con dicho primer y segundo vectores de expresión;
 - (e) seleccionar y clonar un transfectante de dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal que exprese dicha enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa; y
 - (f) optimizar un método de proceso de cultivo celular para la fabricación de dicha enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada,
 donde la enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante se selecciona del grupo que consiste en arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB), iduronato-2-sulfatasa (IDS), sulfamidasa/heparin-N-sulfatasa (SGSH), N-acetilglucosamina-sulfatasa (G6S) y N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS), y donde el método produce una enzima que tiene al menos el 50 % de conversión del resto de cisteína del sitio activo en Cα-formilglicina (FGly); y tiene más de 0,5 cadenas de oligomanosa bis-fosforilada por cadena de proteína.
2. El método de la reivindicación 1, donde dicho primer y segundo vectores de expresión se transfectan en dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma en la etapa (d) de forma simultánea o secuencial.
3. Una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante altamente fosforilada activa producida mediante el método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende la enzima sulfatasa lisosomal de la reivindicación 3 y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
5. Un método para producir una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa, que comprende las etapas de:
 - (a) cultivar una célula de grupo de complementación END3 derivada de ovario de hámster chino (CHO) o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal;
 - (b) preparar un primer vector de expresión de mamífero capaz de expresar dicha GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa adecuada para dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal;
 - (c) preparar un segundo vector de expresión de mamífero capaz de expresar el factor de modificación 1 de sulfatasa humana recombinante (SUMF1) adecuado para dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal;
 - (d) transfectar dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal con dicho primer y segundo vectores de expresión;
 - (e) seleccionar y clonar un transfectante de dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal que exprese dicha GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa; y
 - (f) optimizar un método de proceso de cultivo celular para la fabricación de dicha GALNS humana recombinante altamente fosforilada activa,
 donde el método produce una enzima que tiene al menos el 50 % de conversión del resto de cisteína de la posición 53 en Cα-formilglicina (FGly); y tiene más de 0,5 cadenas de oligomanosa bis-fosforilada por cadena de proteína.
6. El método de la reivindicación 5, donde dicho primer y segundo vectores de expresión se transfectan en dicha célula de grupo de complementación END3 o derivado de la misma en la etapa (d) de forma simultánea o secuencial.
7. Una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante altamente fosforilada activa producida mediante el método de la reivindicación 5 o la reivindicación 6.
8. Una composición farmacéutica que comprende la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante de la reivindicación 7 y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Una enzima sulfatasa lisosomal humana recombinante de la reivindicación 3 producida por una célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal que expresa el factor de modificación 1 de sulfatasa humana (SUMF1) para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece una deficiencia de una enzima sulfatasa lisosomal, donde dicha deficiencia de una enzima sulfatasa lisosomal

se selecciona del grupo que consiste en leucodistrofia metacromática (MLD), mucopolisacaridosis de tipo VI (MPS VI) o síndrome de Maroteaux-Lamy, mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis de tipo IIIa (MPS IIIa) o síndrome de Sanfilippo A, mucopolisacaridosis de tipo IIIb (MPS IIIb) o síndrome de Sanfilippo D y mucopolisacaridosis de tipo IVa (MPS IVa) o síndrome de Morquio A.

5

10. Una enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) humana recombinante de la reivindicación 7 producida por una célula de grupo de complementación END3 derivada de CHO o un derivado de la misma defectuoso en acidificación endosomal que expresa el factor de modificación 1 de sulfatasa humana (SUMF1) para su uso en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosomal que se asocia con una deficiencia en una o más enzimas sulfatasas lisosomales, donde la enfermedad por almacenamiento lisosomal es deficiencia múltiple de sulfatasa (MSD).

10

FIGURA 1

**SECUENCIA DE POLINUCLEÓTIDOS DEL FACTOR DE MODIFICACIÓN 1
DE SULFATASAS (SUMF1) HUMANO (SEQ ID NO:1)**

ATGGCTCGCGCCCGGCAC TACGGCTGGTGTGTGGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTTCTGTCTCTTTGGTGGTGGTGGTCT
TGGCTGTGTGTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCGGGACCGGTGGGGGCGCGGGGTCCCCTTGGGGGTTCTTTGC
GGCTGGGGACAGCCGCCAGCGGCTTGGCGGCCATGGGCAGTTGGGCAGGCCCTCAGCGATAC TGGCGGGAGGGCTAAC
GGTCCGGGGCGCGGTACCTGGAGAGCGGGCACTTCGGGACTTCAGAGATGGTCCCACTGCCCTGGCTGGAGTATTTACA
ATGGGGACAGGTGATCCTCAGATAAAGCGAGGATGGGGAGGCACCTGGCGAGGAGAGTTACTATTTGATGCCCTTTTAC
ATGGATGCCATATGAGGTCAAGTAACTTGAATTTGAGAGATTTTGTGAAC TCAACTGGCTATTTTGACAGAGGCTTGAG
AAGTTTGGCGACTCCCTTGTCTTTTGAAGGCCATGTTGAGTGGAGCAAGTGAAGACCAATATTTCAACAGGCCAGTTGCA
GCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCCCTAAC TGGGAGACACCCAGAAAGGCGCTGACTCTACTATTCTGCAC
AGGCCGGATCATCCAGTTCCTCCATGTGTGCCGGAAATGATGCGGTTGCC TACTGCACTTGGGCAGGGGAAGCGGCTG
CCACCGGAAGCTGAGTGGGAATACAGCTGTCGGAGGAGGGCTGCATAAATAGACTTTTCCCTTGGGGCAACAAACTG
CAGCCCCAAGCGCAGCATATTATGCCAATCTTGGCAGGGGGAGTTCCCGGTGACCAACACTGGTGAAGGATGGCTTC
CAAGGAATCTGGCCCTGTTGATGCTTCCCTCCCAATGGTATAGGCTTATACACATAGTGGGGAACGCATGGGA
TGGACTTCAGACTGGGTGGAGTCTTCATCATTTCTGTGTAGAAACGCTTAACCCAAAGGTTCCCTCTCTGGGAAG
GACCGAGTGAAGCAAGGTGGATCTTACATGTGCCATAGGTCTTATTTGTACAGGTATC GCTGTGTCTGCTGGGAGC
CAGAACACACCTGATAGCTCTGCTTCGAATCTGGGATTCGGCTGTG CAGCCGACCGCTGCCCCACCATGGACTGA

FIGURA 2

**SECUENCIA DE POLIPÉPTIDOS DEL FACTOR DE MODIFICACIÓN 1 DE
SULFATASAS (SUMF1) HUMANO (SEQ ID NO:2)**

MAAPALGLVCGRCFELGLVLLLLLLLELLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTFQPPGAHGSSAAAKKYSREAN
APGFVFGERQLAHGKMYPIPAQVFTMGITDDPQIKQDCEAFARRVTIDAFYMDAYEVSNTEFEKTVNSIGYLTEAE
HFGDSFVFEGNLSEQVKTINTQQAVAAAPWWLPVNGANWHPPEGPDSTILHRPDHPVLHVSNDAVAYCTWAGKRL
PTEAEWEYSCRGGLHNRLFFWGNKLQPKGQHYANIWQGEFFVINTGEDCGQGTAPVDAFFPNIGTCLTHIVGNANE
WTSQWWTVHREVEETLNPKGPPSGKDRVKEGGSYMCNHRSYCYRYRCAARSQNTFPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

FIGURA 4

SECUENCIA DE POLIPÉPTIDOS DE N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA (SEQ ID NO:4)

MAAVVAATRWQQLLVLSAAGMGASGAPQPPHLLLLLMDENGWGDLCVYGEESRETFNLORMAREGLAEPHFYSA
 NPLOSPSRAALLTGRLEFIENGFIYTNAMARNAYTPQEIIVGGIPDSEQLLPPELLKKAGYPSKIVGKWHLGHRPQFR
 PLKHGFDEWFGSPNCHFGFYDNKAKENIPVYRDGEMVGRYYEEFPINLKTGEANLTQIYLQEALDFIKRQARHHP
 FFLYRAVDATHAPVYASKPFLGTSQPGRYGDAVREIDDSIGKILELLQDLRVADNTEVFFTSNGAALISAPBQGG
 GSNGFFLCGKQITFEAGMREPALAWWEGHVTAGQVSRQLGSLMDLFTLALAGLTPPSDRAIDGLNLLPTLLQG
 RLMDRPIFYYRGDTLMAATLGQHKASHFWTNTGWESEFRQGIQFCPGQNVSGVTTHNLEHHTKLPLIFHLGRDPGE
 RFPLSFASAEYQEALSRTTSVVQQHQEALVPAQPQLNVCNNAVMNWAFFDCEKLGRCLEPPESIPKECLWGH

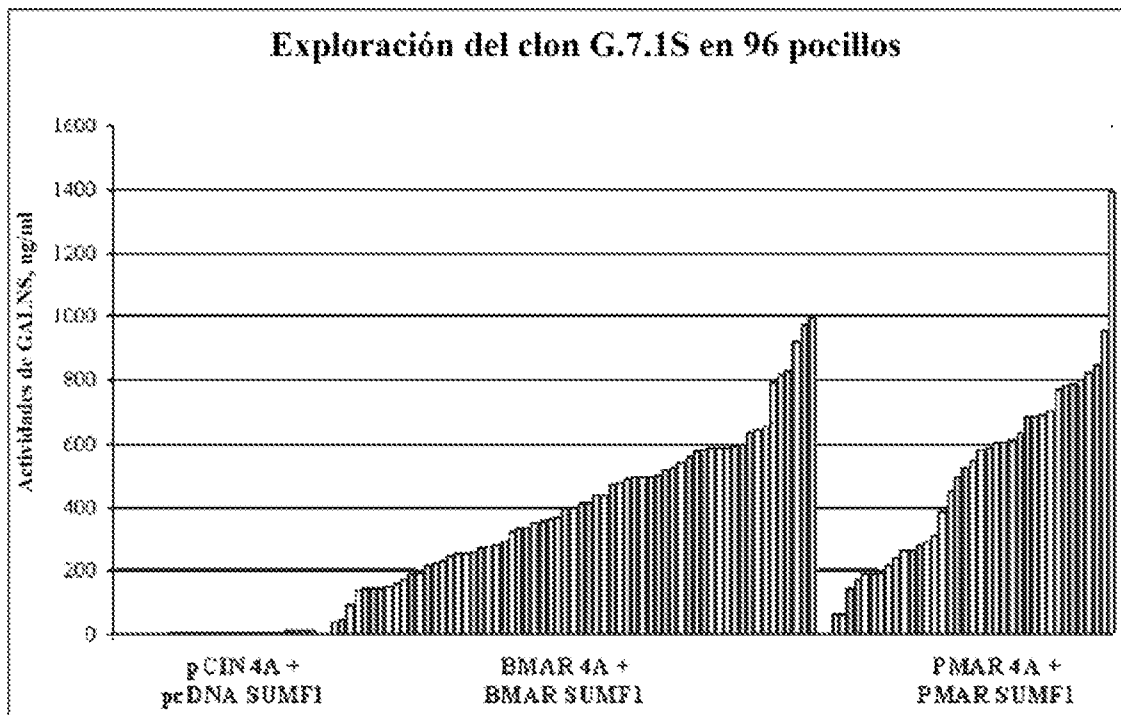
FIGURA 5

ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATASA (GALNS) HUMANA SECRETADA (SEQ ID NO: 5)

	Forma procesada
1 APQPPNILL LMDDMGNGDL GVGEPSPRET PNLDRMAAEG LLEPNFYSAN	
51 PI C SPSRAAL LTGRLPIRNG FYTTNAHARN AYTPQEI VGG IPDSEQLLPE	
101 LLKKAGYVSK IVGKWHLCHR PQFHPLKHGF DEWFGSPNCH FGPDNKKARP	
151 NIPVYRDWEM VGRYYEEFPI NLKTGEA MLT QIYLQEALDF IKRQARHHPF	~40 kDa
201 FLYMAVDATH APVYASKPFL GTSQRGRYGD AVREIDDSIG KILELLODLH	
251 VADNTFVFFT SDNGAALISA PEQCGSNGPF LCGKQTTFEG GMREPALAWN	
301 PGHVTAGQVS HQLGSIMDLF TTSLALAGLT PPSDRAIDGL NLLPTLLQGR	
351 LMDRPIFYR GDTLMAATLG QHKAHFWTWT NSWENFRQGI DFCPCQNV SG	~19 kDa
401 VTTHNLEDHT KLPLIFHLGR DGERFPPLSF ASAEYQEALS RITSVVQQHQ	
451 EALVPAQPQL NVCNNVAVMNW APPGCEKLGK CLTPPESIFK KCLMSEH	

- 1) Peso molecular de la enzima previamente procesada: ~55 kDa
- 2) Conversión de cisterna en Co-formilglicina en la posición 53
- 3) Formas procesadas en lisosoma unido por enlace de disulfuro
- 4) 2 sitios de glicosilación ligada a N en las posiciones 178 y 397
- 5) BisP encontrado en Asn178, no en Asn397

FIGURA 6A-B



B.

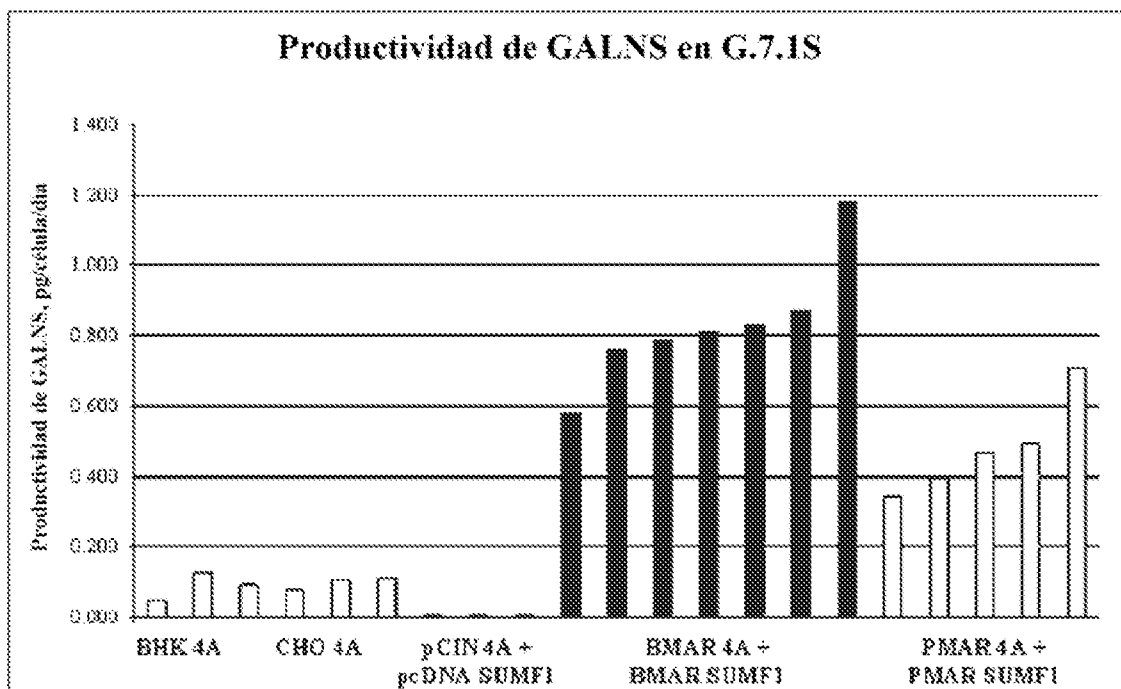


FIGURA 7

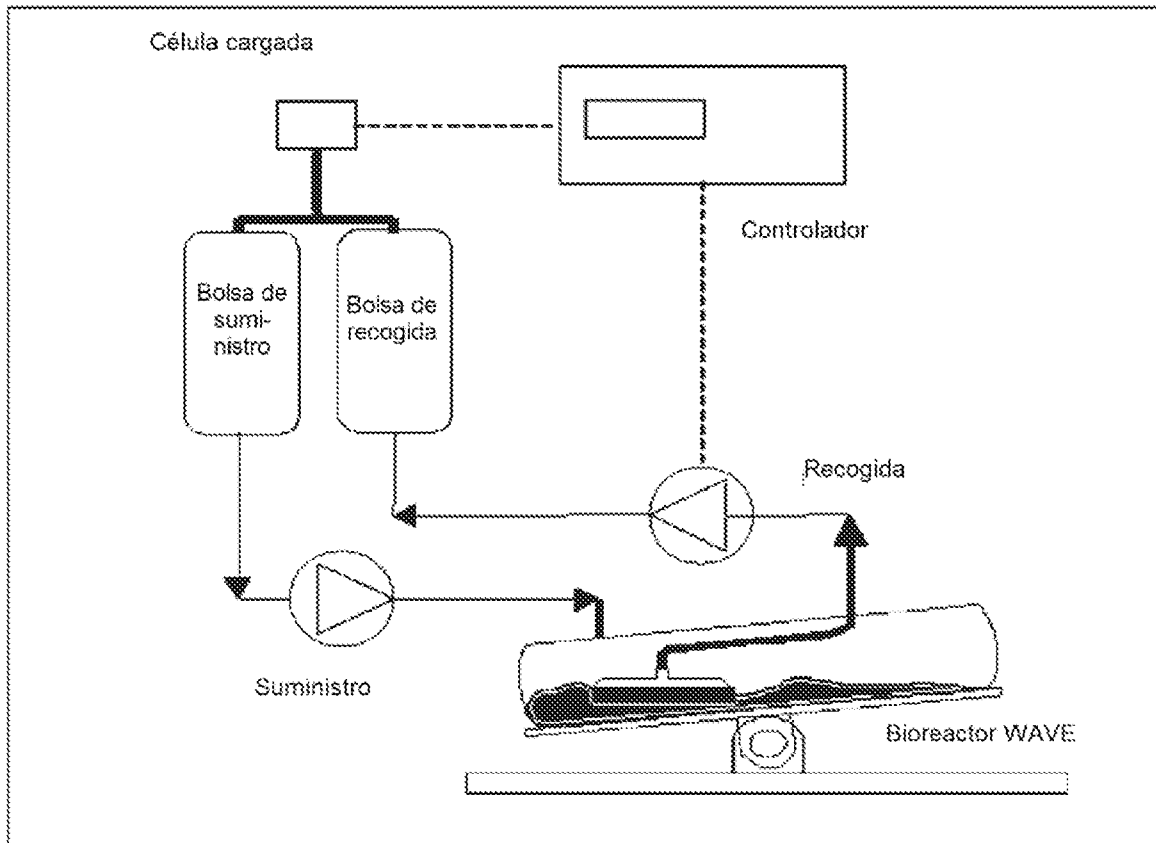


FIGURA 8

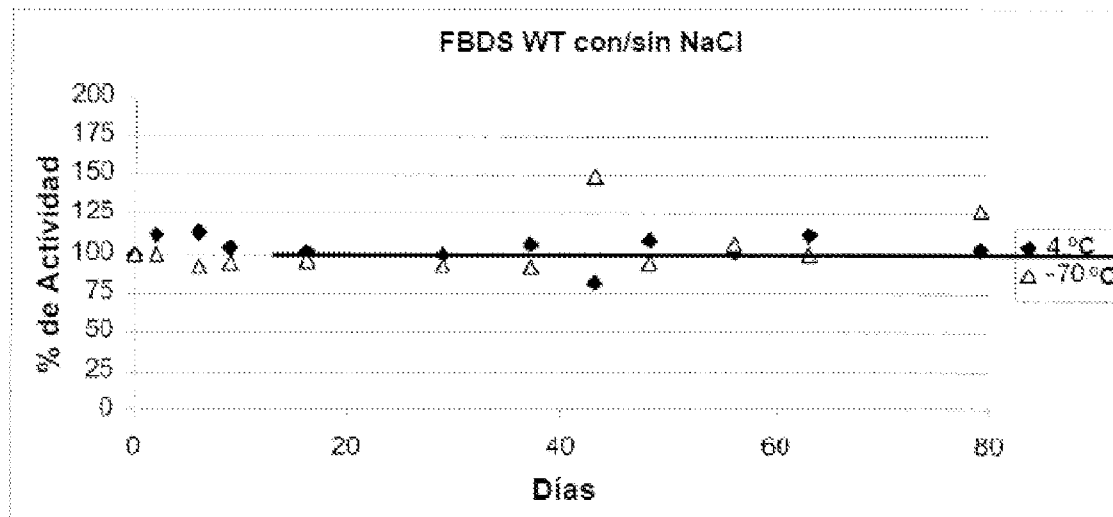
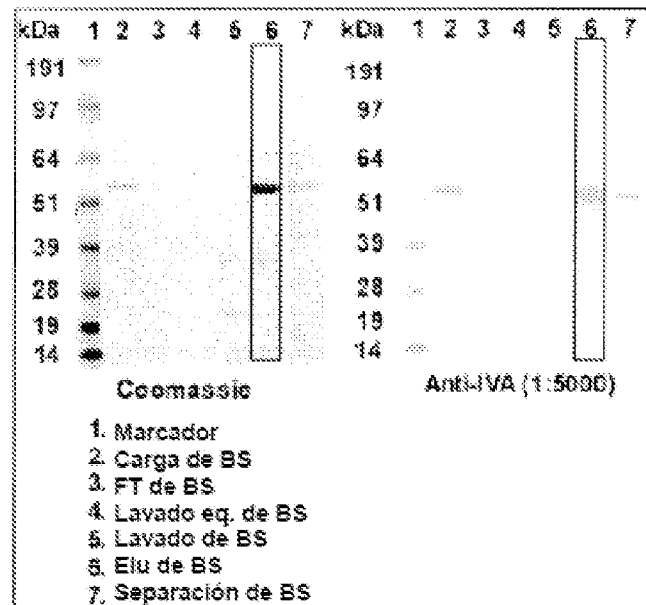


FIGURA 9A-B

A. Cromatografía Blue Sepharose 6 FF



B. Cromatografía Fractogel SE Hi-Cap

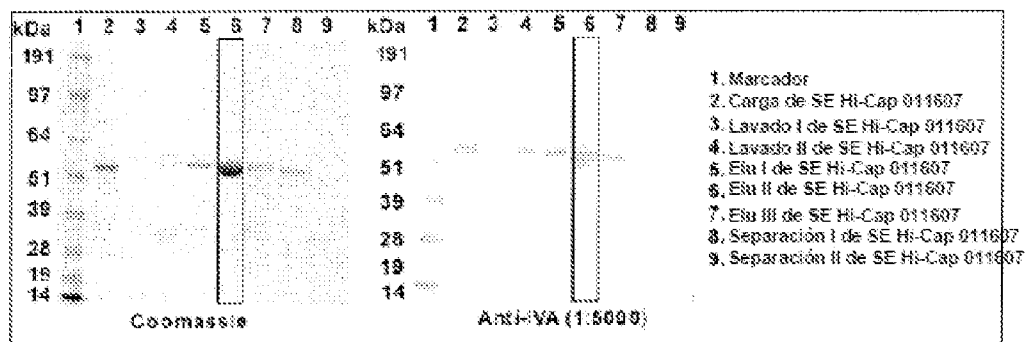
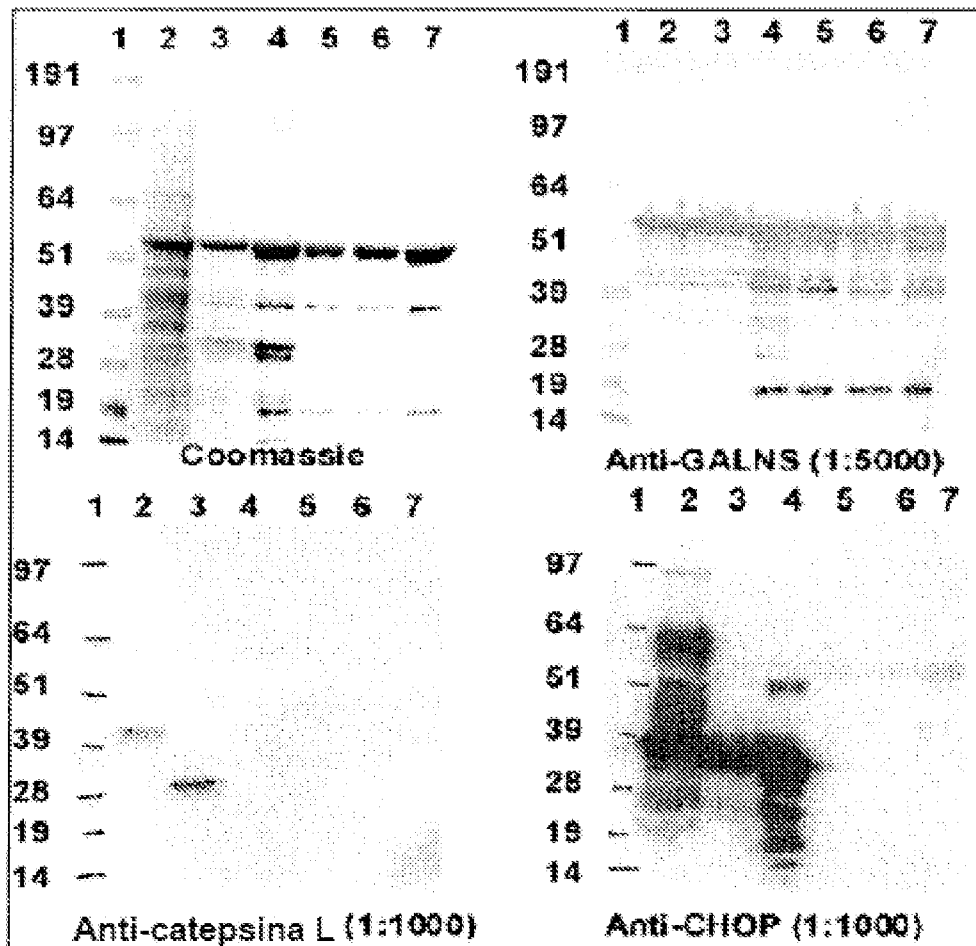


FIGURA 10



1. Marcador
2. UF/DF
3. Carga de SE Hi-Cap 042108
4. Elución de SE Hi-Cap 042108
5. Elución de Zn 042208
6. Elución de TPB 042408
7. FBDS 042508

FIGURA 11

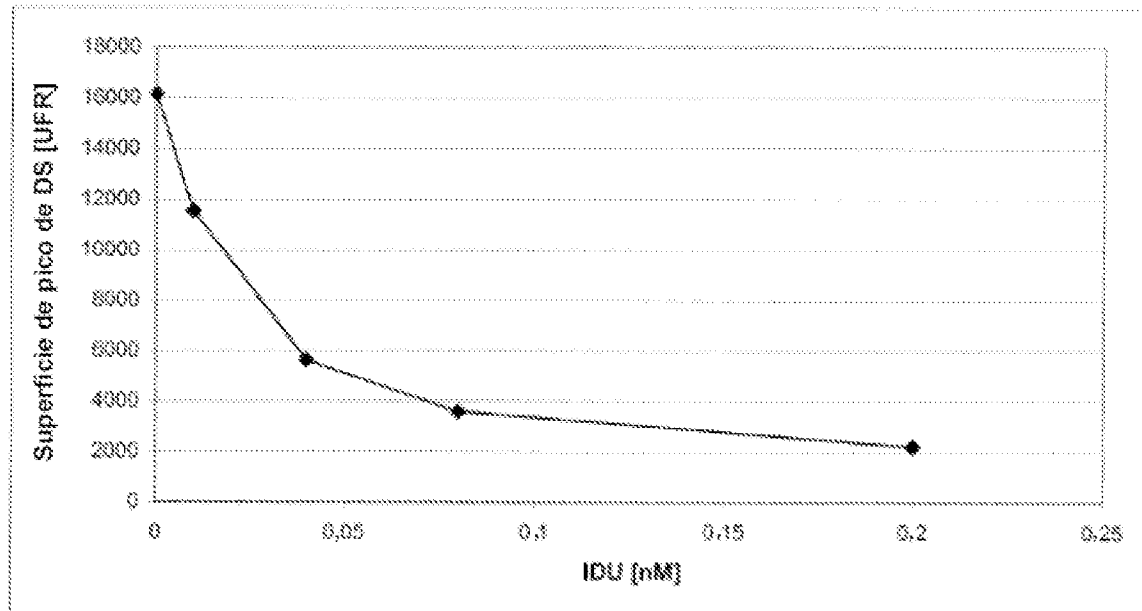


FIGURA 12

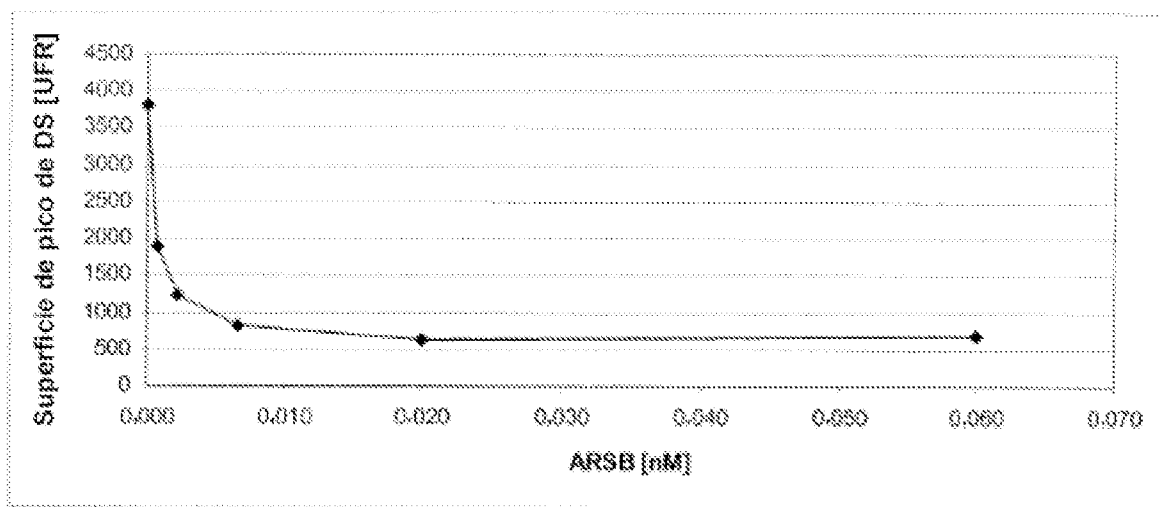


FIGURA 13

