

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.05.31**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2009.03.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.06.20**
129/2012

(73) Titular(es):

GENZYME CORPORATION
500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142-
1108 US

(72) Inventor(es):

FRANK RISKE US
MICHAEL HAYES US
GARY LAZARUS US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE POLISSACÁRIDOS PARA PROMOÇÃO DE ACTIVIDADE ENZIMÁTICA**

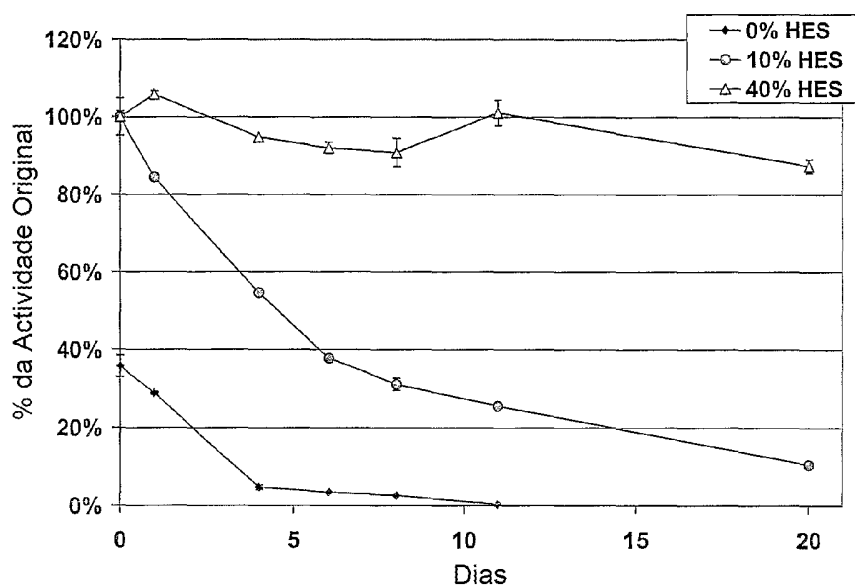
(57) Resumo:

ESTA DIVULGAÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA A PROMOÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DE ENZIMAS ALVOS, INCLUINDO MAS NÃO ESTANDO LIMITADAS A ENZIMAS DE OLIGOSSACÁRIDO/POLISSACÁRIDO, ENZIMAS DE PROTEÍNAS, ENZIMAS DE POLINUCLEÓTIDOS. OS MÉTODOS ENVOLVEM A UTILIZAÇÃO DE UM POLISSACÁRIDO NÃO NATURAL (INCLUINDO MAS NÃO ESTANDO LIMITADO A HES) PARA PROMOVER A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DE UMA ENZIMA EM MEIO LÍQUIDO, EM QUE A CONCENTRAÇÃO DO POLISSACÁRIDO NA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO A ENZIMA ALVO É DESDE CERCA DE 0,01% A CERCA DE 55% P/V.

RESUMO

"UTILIZAÇÃO DE POLISSACÁRIDOS PARA PROMOÇÃO DE ACTIVIDADE ENZIMÁTICA"

Efeito de HES na Promoção da Actividade da α -Glucosidase



Esta divulgação proporciona métodos e composições para a promoção da actividade enzimática de Enzimas Alvos, incluindo mas não estando limitadas a enzimas de oligossacárido/polissacárido, enzimas de proteínas, enzimas de polinucleótidos. Os métodos envolvem a utilização de um polissacárido não natural (incluindo mas não estando limitado a HES) para promover a actividade enzimática de uma enzima em meio líquido, em que a concentração do polissacárido na composição compreendendo a Enzima Alvo é desde cerca de 0,01% a cerca de 55% p/v.

DESCRIÇÃO

“UTILIZAÇÃO DE POLISSACÁRIDOS PARA PROMOÇÃO DE ACTIVIDADE ENZIMÁTICA”

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta divulgação refere-se a composições e métodos para promover a actividade enzimática pela utilização de um polissacárido, incluindo mas não estando limitado a hidroxietilamido. Esta divulgação refere-se ainda a métodos de fabrico de proteínas, métodos esses que envolvem a utilização de enzimas. Esta divulgação refere-se ainda a métodos de fabrico e/ou formulação de enzimas e outras biomoléculas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As enzimas têm encontrado utilização num grande número de aplicações industriais. Por exemplo, as enzimas são muito utilizadas na indústria de detergentes (e. g., amilases e proteases alcalinas bacterianas), na indústria de sumos de fruta e vegetais (e. g., pectinases e xilanases), na indústria de carne (e. g., xilanases, fitases, β -glucanase), na indústria de amido (e. g., amilases), na indústria da pasta e do papel (e. g., xilanases), na indústria têxtil (e. g., celulases, polifenol-oxidases, amilases, xilanases e catalases) e na indústria do couro (e. g., proteases e lipases) (Cherry *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:438-443 (2003)).

Existe também um número de utilizações médicas e terapêuticas de enzimas e dos ácidos nucleicos que as codificam, incluindo para terapia de substituição enzimática (ERT). Na terapia de substituição enzimática, um doente cujo corpo é deficiente numa actividade enzimática é tratado por administração da enzima (uma "enzima ERT") ausente (ou que funciona mal). As enzimas ERT são úteis no tratamento de um número de doenças. Por exemplo, determinados distúrbios de depósito lisossómico (LSD) podem ser eficazmente tratados por administração de uma enzima ERT.

Outros exemplos de enzimas de substituição medicamente significativas são a lactase para a intolerância à lactose e as enzimas pancreáticas de substituição para o tratamento de indivíduos com insuficiência pancreática, incluindo insuficiência pancreática devido a fibrose cística (Wallace *et al.*, *Clin. Pharm.* 12:657-674 (1993)).

Os métodos de promoção de actividade enzimática seriam de valor significativo num número de indústrias. No que diz respeito ao fabrico de proteínas terapêuticas, particularmente aquelas para utilização humana ou veterinária, é geralmente desejável utilizar componentes de origem não animal (não-ADC). Por conseguinte, existe particularmente uma necessidade de proporcionar novos métodos e composições para promover a actividade de enzimas com não-ADC para várias aplicações.

Vrkijan *et al.*, *Pharmaceutical Research*, vol. 11, nº 7, 1994, páginas 1004-1008 descreve o efeito de aditivos poliméricos na agregação induzida termicamente de urocínase de baixo peso molecular.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente divulgação proporciona uma composição compreendendo (a) uma Enzima Alvo e (b) um polissacárido não natural. A Enzima Alvo pode ser *e. g.*, uma enzima de oligossacárido/polissacárido (*i. e.*, uma enzima que actua em oligossacárido(s)/polissacárido(s)), uma enzima de proteínas (*i. e.*, uma enzima que actua em proteína(s) tais como as cinases, fosforilases), uma enzima de polinucleótidos (*i. e.*, uma enzima que actua em polinucleótido(s)) ou outras enzimas industrialmente ou medicamente relevantes, incluindo lipases e semelhantes. A Enzima Alvo pode estar em solução ou pode estar imobilizada num suporte sólido.

O polissacárido não natural é, nalguns casos, um amido modificado. Por exemplo, o polissacárido não natural pode ser um hidroxialquilamido, incluindo mas não estando limitado a hidroxietilamido (HES). O polissacárido não natural pode estar presente a cerca de 0,01 a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01 até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% p/v.

Também é aqui descrita uma composição compreendendo (a) uma Enzima Alvo seleccionada do grupo consistindo de enzimas de oligossacárido/polissacárido, enzimas de proteínas, enzimas de polinucleótidos, lipases e outras enzimas industrial e medicamente relevantes, e (b) um polissacárido não natural, e (c) um substrato da Enzima Alvo, em que a composição compreende

desde cerca de 0,01% a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30%, p/v, cerca de 0,01% até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% p/v do polissacárido. O substrato pode ser, por exemplo, uma proteína, péptido, polinucleótido, nucleótido ou substrato de molécula pequena da Enzima Alvo. Em determinados casos específicos, o substrato da Enzima Alvo é ele mesmo uma enzima, incluindo mas não estando limitado a uma enzima ERT, tal como uma hidrolase lisossómica.

Noutros casos específicos, a divulgação proporciona uma composição em que a Enzima Alvo é um enzima de clivagem de oligossacáridos, o polissacárido é HES e o substrato é uma glicoproteína. Noutros casos ilustrativos, a Enzima Alvo é β -glucocerebrosidase, α -glucosidase, α -galactosidase, sialidase, β -galactosidase, β -N-hexosaminidase (e. g., β -N-acetil-hexosaminidase) ou laronidase.

A divulgação também é dirigida a métodos de promoção de actividade enzimática de uma Enzima Alvo. Num exemplo, o método compreende combinar uma Enzima Alvo com cerca de 0,01 a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01 até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% de um polissacárido não natural, produzindo, desse modo, uma combinação; e manter a combinação sob condições suficientes para promover a actividade enzimática da Enzima Alvo.

A divulgação também é dirigida à utilização de um polissacárido não natural para promover não criogenicamente a actividade de uma enzima em meio líquido, em que a concentração do polissacárido na composição é desde cerca de 0,01 a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01 até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6%.

A divulgação é ainda dirigida a formulações de enzimas (incluindo formulações líquidas e formulações reconstituídas) compreendendo um polissacárido não natural.

A divulgação é ainda dirigida a composições farmacêuticas compreendendo Enzimas Alvos cuja actividade foi promovida por um polissacárido não natural.

Com base na divulgação aqui contida, a presente invenção proporciona um método de promoção da actividade enzimática de uma Enzima Alvo, compreendendo o método:

(i) combinar uma Enzima Alvo, em que a Enzima Alvo é:

(a) uma enzima de oligossacárido/polissacárido seleccionada do grupo consistindo de: Galactosiltransferase, GalNAc-transferase, Oligossacariltransferase, N-acetilglucosaminilfosfotransferase, glicosiltransferase ligada por O, glicosiltransferase ligada por N, α -Manosidase, β -Galactosidase, Sialidase (neuraminidase), β -N-acetil-hexosaminidase,

N-Acetil-glucosamina-1-fosfodiéster

α -*N*-acetilglucosaminidase, *N*-Glicanase
(*N*-glicosidase F), *O*-Glicanase
(endo- α -*N*-acetilgalactosaminidase), Endo- β -*N*-
acetilglucosaminidase H, Sialato-*O*-
acetiltransferase, Sialato-*O*-acetilesterase e
Alfa-glucosidase, ou

- (b) uma hidrolase lisossômica seleccionada do grupo consistindo de: α -Galactosidase A, Ceramidase ácida, α -L-Fucosidase ácida, β -Glucocerebrosidase ácida (GCR), β -galactosidase ácida, Iduronato-2-sulfatase, α -L-Iduronidase, Galactocerebrosidase, α -Manosidase ácida, β -Manosidase ácida, Arilsulfatase B, Arilsulfatase A, *N*-Acetilgalactosamina-6-sulfato-sulfatase, β -Galactosidase ácida, Esfingomielinase ácida, α -Glucosidase ácida, β -Hexosaminidase B, Heparano *N*-sulfatase, α -*N*-Acetilglucosaminidase, Acetil-CoA: α -Glucosaminida *N*-acetiltransferase, *N*-Acetilglucosamina-6-sulfato-sulfatase, α -*N*-acetilgalactosaminidase, Sialidase, β -Glucuronidase e β -Hexosaminidase A;

com cerca de 1% a cerca de 50% p/v de um hidroxialquilamido e com um substrato da Enzima Alvo, produzindo desse modo uma combinação; e

(ii) manter a combinação sob condições suficientes para promover a actividade enzimática da Enzima Alvo, em que as condições são entre cerca de 1 °C e cerca de 40 °C.

Outros aspectos e formas de realização da invenção são definidas nas reivindicações anexas.

O anterior e a descrição detalhada seguinte, e todos os exemplos proporcionados, são não limitativos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 representa a estrutura polimérica de hidroxietilamido (HES). O HES é um polímero de D-glucose; as unidades de monossacárido estão conectadas por ligações α -1,4 e por ligações α -1,6 de ramificação que ocorrem aproximadamente a cada vinte unidades de monómero.

A Figura 2 representa um processo de remodelação oligossacarídica da β -glucocerebrosidase (GCR) por tratamento com sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase (ver, e. g., Furbish *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 673:425-434 (1981)).

A Figura 3 é um fluxograma que ilustra um exemplo dos métodos da divulgação, em que a actividade da Enzima Alvo é promovida por um polissacárido da divulgação.

A Figura 4 é um fluxograma que ilustra um aspecto dos métodos da divulgação/uma forma de realização dos métodos da invenção, em que a Enzima Alvo está em solução e o substrato está imobilizada num suporte sólido.

A Figura 5 é um fluxograma que ilustra um aspecto dos métodos da divulgação/uma forma de realização dos métodos da invenção, em que a Enzima Alvo e o substrato estão em solução.

A Figura 6 é um fluxograma que ilustra um aspecto dos métodos da divulgação/uma forma de realização dos métodos da invenção, em que a Enzima Alvo está imobilizada num suporte sólido e o substrato está em solução.

A Figura 7 é um gráfico da hora versus a % de actividade original que ilustra o efeito do HES na promoção da estabilidade da rGCR.

A Figura 8 é um gráfico de dias versus a % de actividade original que ilustra o efeito do HES na promoção da estabilidade da α -glucosidase.

A Figura 9 é um gráfico do efeito do HES na promoção da estabilidade da α -galactosidase.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Existe uma necessidade para proporcionar novos métodos e composições para promover a actividade de Enzimas Alvos, particularmente, com não-ADC, permitindo assim a utilização mais eficiente de Enzimas Alvos, para várias aplicações.

Quase quatrocentas proteínas terapêuticas, incluindo enzimas terapêuticas e anticorpos monoclonais, encontram-se actualmente em desenvolvimento para o tratamento de doenças humanas (Zopf *et al.*, *Pharmaceutical Visions* 10-14 (Primavera 2002)). Nalguns casos, o fabrico de proteínas terapêuticas pode envolver modificação enzimática da própria proteína terapêutica, incluindo mas não estando limitado a remodelação

oligossacarídica, durante o processo de fabrico. Noutros casos, a proteína terapêutica é ela mesmo uma enzima.

Modificações tal como a remodelação oligossacarídica, podem ser desejáveis para a actividade óptima de determinadas proteínas terapêuticas. Por exemplo, a Imiglucerase (o ingrediente activo na Cerezyme[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA) é uma β -glucocerebrosidase humana de oligossacárido modificado (também conhecida como GCR, β -glucocerebrosidase ácida, β -glucosidase ácida, glucosilceramidase, β -D-glucosil-N-acilesfingosina gluco-hidrolase, EC 3.2.1.45) produzida utilizando células recombinantes e é utilizada para tratar doentes com doença de Gaucher, um distúrbio genético raro e devastador provocado por uma deficiência ou mau funcionamento da β -glucocerebrosidase. A Imiglucerase sofre remodelação oligossacarídica durante o seu fabrico: oligossacáridos ligados por N complexos são submetidos a enzimas de remodelação oligossacarídica de modo a expor os resíduos centrais de manose para reconhecimento pelos receptores de manose na membrana do plasma de macrófagos, permitindo que a GCR modificada seja sujeita a endocitose e administrada mais eficazmente aos lisossomas dos macrófagos (ver, e. g., Furbish et al., *Biochim. Biophys. Acta* 673:425-434 (1981)).

A presente divulgação proporciona métodos e composições para promover a actividade enzimática de uma Enzima Alvo combinando a Enzima Alvo com um polissacárido da divulgação. A presente divulgação proporciona ainda métodos e composições para promover não criogenicamente a actividade enzimática de uma Enzima Alvo combinando a Enzima Alvo em meio líquido (e. g., em solução ou immobilizada num suporte sólido) com um polissacárido da divulgação. Sem limitação no que se refere ao mecanismo, o(s)

polissacárido(s) da divulgação pode(m) "promover" a actividade enzimática aumentando a actividade específica da Enzima Alvo, prolongando a actividade da Enzima Alvo ou reduzindo a desnaturação, degradação ou agregação da Enzima Alvo e/ou estabilizando a Enzima Alvo. Assim, por exemplo, em determinados exemplos da divulgação, a utilização de um polissacárido não natural de acordo com os métodos da divulgação permite utilizar uma menor quantidade da Enzima Alvo *in vivo* ou em uma reacção enzimática *in vitro*, por comparação com utilização na ausência do polissacárido. A actividade enzimática e reacções enzimáticas podem ser medidas por métodos correntes na técnica (ver, e. g., Eisinger *et al.*, *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002).

Foi aqui demonstrado que as Enzimas Alvos são estabilizadas pela presença de HES. Foi também demonstrado que o HES promove a actividade enzimática de Enzimas Alvos, diminui a quantidade de Enzima Alvo necessária para conseguir a modificação do substrato e alarga a gama de pH à qual uma Enzima Alvo pode ser utilizada. Foi também aqui demonstrado que o HES é compatível com uma variedade de Enzimas Alvos e concentrações de Enzima Alvo; o HES obtido de diferentes fontes comercialmente disponíveis, é comparável na promoção da actividade da Enzima Alvo; e a promoção da actividade da Enzima Alvo pelo HES é eficaz numa grande gama de volumes do sistema.

Enzimas Alvos

Os métodos da divulgação, incluindo aqueles da invenção, são largamente aplicáveis à promoção da actividade enzimática de Enzimas Alvos. Como aqui utilizado, o termo "Enzima Alvo"

refere-se a uma enzima cuja actividade será ou foi promovida por exposição a um polissacárido não natural de acordo com os métodos desta divulgação. No entanto, o sangue inteiro, plasma sanguíneo, activador de plasminogénio tecidual, interleucinas, toxinas, interferões, proteína C, globulinas gama e colagénios estão especificamente excluídos da definição de "Enzima Alvo". Uma ou mais Enzimas Alvos podem ser utilizadas em conjunto nos métodos e composições da divulgação. Sempre que o termo "Enzima Alvo" for utilizado, deve ser entendido que este termo abrange uma ou mais enzimas. Em determinados aspectos da divulgação, e. g. em determinados aspectos da invenção, a Enzima Alvo é isolada ou purificada.

Nalguns casos, a Enzima Alvo pode ser uma enzima industrialmente relevante tal como, e. g., acetolactato-descarboxilase, proteinase ácida, álcool-desidrogenase, protease alcalina, aminoácido-oxidase, aminoacilase, aminopeptidase, α -amilase, β -amilase, aspártico- β -descarboxilase, bromelaína, nucleass, celulase, cloroperoxidase, ciclodextrina glicosiltransferase, β -glucanase, β -glucosidase, dextranase, dextrinase, nucleassease, α -galactosidase, glucoamilase, glutaminase, hemicelulase, histidase, invertase, isomerase, lactase, liase, lisozima, naringinase, oxirredutase, pectinase, penicilina-acilase, pepsina, peroxidase, pululanase, subtilisina ou semelhantes.

Noutros casos, a Enzima Alvo pode ser uma enzima de oligossacárido/polissacárido que pode afectar uma ligação covalente de um oligossacárido ou um polissacárido (ver, e. g., Quadro 1). Por exemplo, uma enzima de oligossacárido/polissacárido pode ser uma glicosiltransferase ou uma glicosidase. Noutros casos, a Enzima Alvo é uma enzima de

proteínas que pode afectar uma proteína ou péptido, ou as cadeias laterais dos seus aminoácidos, resultando numa alteração molecular na proteína (ver, e. g., Quadro 2). Por exemplo, uma enzima de proteínas pode ser uma nuclease ou fosforilase. Noutros casos, a Enzima Alvo é uma enzima de polinucleótidos que pode afectar um polinucleótido, ou um nucleótido, resultando numa alteração molecular no polinucleótido (ver, e. g., Quadro 3). Por exemplo, uma enzima de polinucleótidos pode ser uma ligase ou endonuclease. Para outros casos, a Enzima Alvo pode efectuar uma modificação covalente numa molécula pequena, tal como dissociação, adição ou outra alteração a essa molécula e. g., glucose-isomerase que converte a glucose em frutose. Assim, em determinados casos, a Enzima Alvo da divulgação pode ser uma glicosidase, glicosiltransferase, cinase, fosfatase, fosforilase, sulfatase, nuclease, nucleasa, nucleasa ou ligase. Uma Enzima Alvo pode actuar *in vivo* ou *in vitro*, e/ou pode actuar num oligossacárido, polissacárido, proteína, péptido, lípido, molécula pequena ou polinucleótido isolado ou purificado.

Quadro 1: Exemplos de Enzimas de Oligossacárido/Polissacárido

Enzima de Oligossacárido/Polissacárido
<i>Glicosiltransferases</i>
Galactosiltransferase
GalNAc-transferase
Oligossacariltransferase
N-acetilglucosaminilfosfotransferase
glicosiltransferase ligada por O
glicosiltransferase ligada por N

(continuação)

Enzima de Oligossacárido/Polissacárido
<i>Exo-glicosidases</i>
α -Manosidase
β -Galactosidase
Sialidase (neuraminidase)
β - <i>N</i> -acetil-hexosaminidase
<i>N</i> -Acetil-glucosamina-1-fosfodiéster α - <i>N</i> -acetilglucosaminidase
<i>Endo-glicosidases</i>
<i>N</i> -Glicanase (<i>N</i> -glicosidase F)
<i>O</i> -Glicanase (endo- α - <i>N</i> -acetilgalactosaminidase)
Endo- β - <i>N</i> -acetilglucosaminidase H
<i>Outras</i>
Sialato- <i>O</i> -acetiltransferase
Sialato- <i>O</i> -acetilesterase
α -glucosidase

Quadro 2: Exemplos de Enzimas de proteínas

Enzima de Proteínas
Protease
Miristoilase
Desformilase
Enzima de excisão de metionina <i>N</i> -terminal
Fosforilase
Enzima de acetilação
Enzima de formação de ligação dissulfureto
Enzima de palmitoilação
Enzima de hidroxilação

(continuação)

Enzima de Proteínas
Enzima de carboxilação
Enzima de nitração
Enzima de sulfatação
Enzima de ADP-ribosilação
Desamidase
Glicosilase ligada por N
Glicosilase ligada por O
Enzima de glicosil-fosfoinositolação
Farnesilase
Geranilgeranilase
Metilase
Enzima de amidação
Enzima de ubiquitinação

Quadro 3: Exemplos de Enzimas de polinucleótidos

Enzima de Polinucleótidos
Exorribonuclease
Endorribonuclease
Exodesoxirribonuclease
Endodesoxirribonuclease
Endonuclease de restrição (Tipos I, II e III)
Topoisomerase I
Topoisomerase II
Ligase

Nalguns casos, a Enzima Alvo é uma enzima que modifica uma proteína terapêutica, *i. e.*, uma proteína fabricada com a finalidade de ser administrada a um doente como um agente terapêutico, profilático ou de diagnóstico. Por exemplo, a

Enzima Alvo pode ser uma enzima de oligossacárido/polissacárido, incluindo mas não estando limitado a uma glicosidase ou glicosiltransferase. Exemplos de glicosidasas incluem α -manosidase, sialidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase e endo- β -galactosidase. Exemplos de glicosiltransferases incluem α -1,2-fucosiltransferase, transferases dos grupos sanguíneos A e B, e as UDP-GalNAc:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferases. Para outros exemplos de enzimas de modificação de açúcar, ver, e. g., Quadro 1 e Fukuda *et al.*, *Glycobiology: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 1993; Brooks *et al.*, *Functional and Molecular Glycobiology*, BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, RU, 2002. Em determinados casos preferidos, e. g. em determinadas formas de realização, a Enzima Alvo é sialidase, β -galactosidase e/ou β -hexosaminidase.

Nalguns casos, a Enzima Alvo é ela mesmo uma proteína terapêutica. Por exemplo, as Enzimas Alvos incluem especificamente, mas não estão limitadas às, enzimas ERT listadas no Quadro 4. Por exemplo, a Enzima Alvo pode ser β -glucocerebrosidase, α -galactosidase ou α -glucosidase. Por exemplo, como se mostra nos Exemplos 1-3, as glucocerebrosidase, α -glucosidase e α -galactosidase são estabilizadas na presença de HES.

Nalguns casos, a Enzima Alvo pode estar em mais do que uma categoria dependendo da aplicação para a qual a Enzima Alvo é utilizada.

Quadro 4: Exemplos de LSD e Enzimas Anómalas ou Deficientes Correspondentes

Distúrbio de depósito lisossómico	Enzima Anómala ou Deficiente (Hidrolase lisossómica)
Fabry	α -Galactosidase A
Farber	Ceramidase ácida
Fucosidose	α -L-Fucosidase ácida
Gaucher tipos 1, 2 e 3	β -Glucocerebrosidase ácida (GCR)
Gangliosidose G _{M1}	β -galactosidase ácida
Hunter	Iduronato-2-sulfatase
Hunter-Scheie	α -L-Iduronidase
Krabbe	Galactocerebrosidase
α -Manosidose	α -Manosidase ácida
β -Manosidose	β -Manosidase ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatase B
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatase A
Morquio A	N-Acetilgalactosamina-6-sulfato-sulfatase
Morquio B	β -Galactosidase ácida
Niemann-Pick	Esfingomielinase ácida
Pompe	α -Glucosidase ácida
Sandhoff	β -Hexosaminidase B
Sanfilippo A	Heparano N-sulfatase
Sanfilippo B	α -N-Acetilglucosaminidase
Sanfilippo C	Acetil-CoA: α -Glucosaminida N-acetiltransferase
Sanfilippo D	N-Acetilglucosamina-6-sulfato-sulfatase
Schindler-Kanzaki	α -N-acetilgalactosaminidase
Sialidose	Sialidase
Sly	β -Glucuronidase
Tay-Sachs	β -Hexosaminidase A

Os distúrbios de depósito lisossómico são uma classe de doenças genéticas, compreendendo mais de quarenta distúrbios que se relacionam com uma deficiência na actividade hidrolase lisossómica. O lisossoma funciona como um compartimento principal de degradação na célula e contém múltiplas enzimas necessárias para realizar esta função. A característica distintiva dos LSD é a acumulação anormal de metabolitos nos lisossomas, o que leva à formação de um grande número de lisossomas dilatados. Por conseguinte, um LSD pode ser tratado através da administração de uma enzima ERT que corresponde à hidrolase lisossómica anómala ou deficiente correlacionada com o LSD particular.

Por exemplo, como discutido acima, a Imiglucerase (o ingrediente activo na Cerezyme[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA) é uma β -glucocerebrosidase humana de oligossacárido modificado (também conhecida como GCR, β -glucocerebrosidase ácida, β -glucosidase ácida, glucosilceramidase, β -D-glucosil-N-acilesfingosina gluco-hidrolase, EC 3.2.1.45) preparada utilizando células recombinantes e é utilizada para tratar doentes com doença de Gaucher, um distúrbio genético raro e devastador provocado por uma deficiência ou mau funcionamento da β -glucocerebrosidase. Como se mostra no Exemplo 1, a β -glucocerebrosidase é estabilizada pela presença de um polissacárido não natural tal como o HES.

A Alglucosidase Alfa, (também conhecida como α -glucosidase, Alfa-glucosidase ou alfa-glucosidase ácida, Reg CAS: 420784-05-0, EC 3.2.1.3), o ingrediente activo na Myozyme[®], (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) é uma enzima ERT para o tratamento da doença de Pompe, uma doença rara, debilitante,

progressiva que é frequentemente fatal. A doença de Pompe (doença de depósito de glicogénio tipo II, GSD II, glicogenose tipo II, deficiência de maltase ácida) é um distúrbio hereditário do metabolismo do glicogénio provocado pela ausência ou deficiência acentuada da enzima lisossómica, alfa-glucosidase ácida (GAA). Como se mostra no Exemplo 2, a α -glucosidase é estabilizada pela presença de um polissacárido não natural, tal como o HES.

Outro exemplo de uma enzima ERT é a Fabrazyme[®] (agalsidase beta) que é utilizada para tratar a doença de Fabry. As pessoas com doença de Fabry não têm ou têm quantidades insuficientes de uma enzima essencial chamada alfa-galactosidase A ou alfa-GAL, que ajuda o corpo a degradar uma substância gorda chamada globotriaosilceramida (GL-3). A Fabrazyme[®] (agalsidase beta), uma substituição para a enzima em falta, actua como a enzima alfa-GAL natural e visa a GL-3 no interior da célula. Uma vez dentro da célula, ela degrada o GL-3 em componentes mais pequenos que podem ser removidos da célula por processos naturais. Como se mostra no Exemplo 3, a α -galactosidase também é estabilizada pela presença de um polissacárido não natural, tal como o HES.

Ainda outro exemplo de uma enzima ERT é a Aldurazyme[®] (laronidase) que é utilizada para tratar a Mucopolissacaridose I (MPS I), uma doença genética autossómica recessiva, rara que afecta múltiplos sistemas de órgãos e tecidos. A doença é provocada por um defeito no gene que codifica a enzima lisossómica alfa-L-iduronidase. Em consequência deste defeito, as células de pessoas com MPS I são incapazes de produzir a enzima ou produzem-na em quantidades baixas, o que resulta numa incapacidade do lisossoma para actuar na degradação por passos

de determinadas glicosaminoglicanos (GAG) - nomeadamente sulfato de dermatano e sulfato de heparano.

Nalguns casos, *e. g.* nalgumas formas de realização da invenção, a Enzima Alvo está em meio líquido, *i. e.*, num ambiente líquido ou parcialmente líquido. A Enzima Alvo em meio líquido pode estar immobilizada num suporte sólido ou pode estar dispersada, parcialmente dissolvida ou dissolvida em solução. A Enzima Alvo está immobilizada num suporte sólido se estiver ligada, covalentemente ou não covalentemente, directa ou indirectamente, a um material sólido ou semi-sólido, *e. g.*, uma resina. Por exemplo, a Enzima Alvo pode ser immobilizada num suporte sólido, *e. g.*, por absorção física ou uma ligação covalente, ou através de uma interacção com um entidade que é posta directamente em contacto com o suporte sólido. Os suportes sólidos ilustrativos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, uma Enzima Alvo pode ser immobilizada num suporte sólido por uma interacção hidrófoba, uma interacção electrostática, uma interacção ião de metal-ligando, uma interacção de molécula pequena, uma interacção peptídica, uma interacção de pseudo-afinidade, uma reacção antigénio-anticorpo ou outra interacção de afinidade. Em exemplos preferidos, o suporte sólido é insolúvel no meio líquido, aquoso ou outro, contendo a Enzima Alvo e o polissacárido (e opcionalmente o substrato).

Nalguns casos, um substrato da Enzima Alvo está presente com a Enzima Alvo. O substrato pode estar immobilizado num suporte sólido ou pode estar disperso, parcialmente dissolvido ou dissolvido em solução. O substrato pode ser, por exemplo, uma proteína, péptido, polinucleótido, nucleótido, lípido ou molécula pequena. Nalguns casos, o substrato é ele próprio uma enzima, incluindo mas não estando limitado a uma hidrolase

lisossómica tais como aquelas listadas no Quadro 4. Nos casos em que o substrato é uma enzima, o substrato também pode ser uma Enzima Alvo.

Como é bem conhecido na técnica, as enzimas são tipicamente activas em gamas de pH, temperatura e concentração de substrato particulares. Nalguns casos, por exemplo, a gama de actividade de pH para uma Enzima Alvo da divulgação pode ser desde cerca de: pH 3 a pH 9, pH 3 a pH 6, pH 4 a pH 8, pH 5 a pH 7 ou pH 5,5 a pH 6,5. Nalguns casos, para enzimas acidófilas, o pH pode ser um pH ácido (e. g., abaixo de um pH de cerca de 6,5, 5,5, 4,5, 3,5 ou 2,5). Noutros casos, para enzimas alcalofílicas, o pH pode ser um pH básico (e. g., acima de um pH de cerca de 7,5, 8,5, 9,5, 10,5 ou 11,5). Nalguns casos, por exemplo, a gama de temperaturas para uma Enzima Alvo da divulgação pode ser desde cerca de: 2-50 °C, 10-37 °C, 15-32 °C ou 20-30 °C. Nalguns casos, para enzimas termofílicas, a temperatura é acima de uma temperatura de cerca de: 37 °C, 45 °C, 50 °C, 60 °C, 75 °C ou 85 °C. Noutros casos, para enzimas mesófilas, a temperatura é de cerca de: 20- 40 °C, 25-37 °C ou 30-35 °C. Ainda noutros casos, para enzimas psicrofílicas, a temperatura é abaixo de uma temperatura de cerca de 30 °C, 25 °C, 20 °C, 10 °C ou 5 °C. Nalguns casos, e. g., nalgumas formas de realização da invenção, por exemplo, a proporção de enzima em relação ao substrato pode ser desde cerca de: 1:1000000 000, 1:1000000, 1:100000, 1:10000, 1:1000, 1:100, 1:10 ou 1:1.

No entanto, de um modo geral, entende-se que as cinéticas enzimáticas são governadas pelos princípios da cinética de Michaelis-Menten, ver, e. g., Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd Edition, David L. Nelson et al. Eds, Worth Publishers, NI, NI.

Por conseguinte, utilizando tais princípios, um técnico médio na matéria pode determinar a cinética de uma Enzima Alvo através de experiências simples e de rotina. Além disso, a informação sobre enzimas e a informação sobre nomenclatura está disponível em Swiss-Prot. *Enzyme Nomenclature Database* - ExPASy (Expert Protein Analysis System), Versão 37, Março de 2005, e actualizações até 02 de Agosto de 2005 <URL:<http://au.expasy.org/enzyme/>>; ver também, Bairoch A. *The ENZYME database in 2000*. *Nucleic Acids Res.* 28:304-305(2000). Ver também, Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), actualização de 27 de Julho de 2005, <URL:<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>; ver também versão impressa: *Enzyme Nomenclature* 1992 [Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12-227164-5, 0-12-227165-3] com Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) e Suplemento 5 (em *Eur. J. Biochem.* 1994, 223:1-5; *Eur. J. Biochem.* 1995, 232:1-6; *Eur. J. Biochem.* 1996, 237:1-5; *Eur. J. Biochem.* 1997, 250:1-6 e *Eur. J. Biochem.* 1999, 264:610-650; respectivamente).

Polissacáridos

Um polissacárido é um polímero de monossacáridos linear ou ramificado, de origem natural ou sintético, compreendendo duas ou mais unidades de monossacárido. Em determinados casos, os polissacáridos da divulgação (e. g. em determinadas formas de realização, os polissacáridos que são utilizados na invenção) compreendem pelo menos cerca de 5, 10, 20, 30, 50, 75 ou mais unidades. Em determinados aspectos da divulgação, e. g. em determinados aspectos da invenção, as unidades de monossacárido

que constituem um polissacárido são unidades não idênticas. Os produtos de hidrólise de polissacáridos e as misturas de polissacáridos estão abrangidos pelo termo polissacárido como aqui utilizado.

Um polissacárido não natural refere-se a um polissacárido que foi modificado a partir do seu estado natural. Isto é, a estrutura química e/ou actividade biológica do polissacárido não natural está modificado em comparação com a estrutura química e/ou actividade biológica do polissacárido no seu estado natural (antes da modificação). Por exemplo, grupos hidrófilos funcionais são adicionados a uma molécula de polissacárido de modo a melhorar a solubilidade (e. g., para obter um polissacárido não natural que é cerca de 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% solúvel em solução aquosa). Além disso, grupos funcionais aniónicos ou catiónicos obtidos podem ser adicionados a uma molécula de polissacárido. Os métodos adequados utilizados para produzir um polissacárido não natural (e. g., utilização de meios térmicos e/ou químicos) são conhecidos dos especialistas na técnica.

Embora a maior parte da discussão aqui se refira a polissacáridos não naturais, incluindo mas não estando limitados a hidroxialquilamidos modificados ou Ficoll[®], reconhece-se que podem ser utilizados polissacáridos naturais, incluindo mas não estando limitados a α -amilose, amilopectina ou dextrano nas composições e métodos da presente divulgação.

Nalguns casos, o polissacárido é um não amido não natural, tal como um amido quimicamente modificado, incluindo mas não estando limitado a hidroxialquilamidos (incluindo mas não

estando limitado a HES ou hidroxipropilamido), carboximetilamidos, dietilaminoetilamido, cloreto de (hidroxipropil)trimetilamónio-amido, cianoetilamido, benzilamido ou acetilamido (ver, e. g., Hjermsstad "Starch Hydroxyethyl Ethers and Other Starch Ethers" em: Whistler et al., Eds., *Industrial Gums*, Academic Press: Nova Iorque, 1973 e Moser, "Hydroxyethylated Starches". em Wurzburg, Ed., *Modified Starches: Properties and Uses*, CRC Press: Boca Raton, Florida, 1987).

Nos métodos da presente invenção é utilizado um polissacárido que é um hidroxialquilamido.

Em determinados casos da divulgação, e. g. em determinadas formas de realização da invenção, o polissacárido é um hidroxialquilamido seleccionado do grupo consistindo de hidroximetilamido, HES, hidroxipropilamido e hidroxibutilamido.

As composições e métodos da divulgação podem conter ou utilizar desde cerca de 0,1% até cerca de 55% (p/v) do polissacárido. Em determinados casos, a concentração de polissacárido pode ser desde cerca de 0,01% a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01 até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% p/v. Em determinados casos, a concentração de polissacárido é pelo menos cerca de 5% (p/v). Noutros casos, a concentração de polissacárido é (p/v) pelo menos 2%, 4%, 5%, 6%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 20%, 30% ou 40% em que a concentração de polissacárido é inferior a 55% (p/v). À luz da divulgação aqui, a concentração de polissacárido

particular que promove a actividade de uma Enzima Alvo particular pode ser determinada por um técnico médio na matéria através de experiências simples e de rotina.

Como um especialista na técnica reconhecerá, o peso molecular médio ("PMM") do polissacárido da divulgação dependerá do polissacárido particular utilizado. No entanto, em geral, o peso molecular médio do(s) polissacárido(s) da divulgação podem variar, e. g., desde cerca de: 20 kDa a 2 600 kDa, 100 kDa a 2000 kDa, 300 kDa a 1500 kDa, ou 400 kDa a 800 kDa. Num caso preferido, e. g. numa forma de realização preferida da invenção, o peso molecular médio do polissacárido é desde cerca de 400 kDa até cerca de 800 kDa. Noutro caso preferido, e. g., noutra forma de realização preferida da invenção, o peso molecular médio do polissacárido é desde cerca de 450 kDa até cerca de 800 kDa. Noutro caso preferido, e. g., noutra forma de realização preferida da invenção, o peso molecular médio do polissacárido é desde cerca de 400 kDa até cerca de 750 kDa. Como um especialista na técnica reconhecerá, em geral, uma gama peso molecular inferior de um polissacárido terá uma maior solubilidade (p/v, p/p) em comparação com um polímero de peso molecular mais elevado desse mesmo polissacárido.

Nalguns casos preferidos, e. g. nalgumas formas de realização preferidas da invenção, o polissacárido é HES. HES é um polímero que pode ser preparado a partir do amido de origem vegetal amilopectina, um polímero de derivado de D-glucose, e. g., de milho, batatas ou trigo, por hidroxietilação, e. g., por tratamento com óxido de etileno e um alcóxido de metal, e hidrólise, e. g., com ácido clorídrico (ver, e. g., Hjermsstad "*Starch Hydroxyethyl Ethers and Other Starch Ethers*". Em: Whistler et al., Eds., *Industrial Gums*, Academic Press: Nova

Iorque, 1973 e Lutz *et al.*, *Acta Anaesthesiol. Belg.* 35 (Supl.):21-26 (1984). A fórmula estrutural do HES é representada na Figura 1. Sem limitação, as unidades de glucose do HES são geralmente ligadas por ligações α -1,4 e por ligações α -1,6 de ramificação que ocorrem aproximadamente a cada 20 unidades de monómero. O HES está comercialmente disponível de várias fontes (ver Exemplos aqui). Uma vantagem do HES é que é geralmente considerado ser seguro e não tóxico, e está aprovado como um aditivo alimentar indirecto e como um extensor do plasma sanguíneo (ver, e. g., Moser, "*Hydroxyethylated Starches*". Em Wurzburg, Ed., *Modified Starches: Properties and Uses*, CRC Press: Boca Raton, Florida, 1987 e Treib *et al.*, *Intensive Care Med.* 25:258-268 (1999)). O HES também é um derivado não animal. Por conseguinte, o HES é particularmente útil nos métodos e composições da divulgação, e. g. nos métodos da invenção, quando aplicado ao fabrico de agentes terapêuticos ou outros agentes para utilização humana.

O HES pode diferir quanto ao seu peso molecular médio e extensão de hidroxietilação. O peso molecular médio pode ser indicado como um peso molecular médio numérico ou um peso molecular médio ponderal. A extensão de hidroxietilação pode ser medida como uma proporção molar de substituição ("MS"; o número de grupos hidroxietilo por unidade de glucose) ou como um grau de substituição ("DS"; a fracção de unidades de glucose que contêm grupos hidroxietilo). Embora o MS e a DS não sejam idênticos, os termos são frequentemente permutados na literatura. O MS e a DS de uma dada amostra são comparáveis quando o valores são pequenos, mas o MS é maior do que a DS quando a amostra está mais substituída. Um HES particular pode ser identificado pelo seu peso molecular médio ponderal (em kDa) e MS; por exemplo, um HES pode ser indicado como um HES 480/0,7,

HES 450/0,7, HES 200/0,5 ou HES 130/0,4. Para mais informações, ver, e. g., Thompson, "Hydroxyethyl Starch". Em Hennesen, Ed., *Developments in Biological Standardization* Vol. 48, S. Karger: Basel, Suíça; Moser, "Hydroxyethylated Starches". Em Wurzburg, Ed., *Modified Starches: Properties and Uses*, CRC Press: Boca Raton, Florida, 1987; e Treib et al., *Intensive Care Med.* 25:258-268 (1999). As variantes de HES incluem mas não estão limitadas a (de modo a aumentar o PMM) TetraamidoTM, pentaamido, hexaamido e hetaamido.

Em casos preferidos, e. g., em formas de realização preferidas da invenção, o polissacárido é HES (e. g., HES 480/0,7 ou HES 450/0,7). O HES, em geral, tem um PM médio ponderal (PMM) de, aproximadamente, 400-550 kDa e um MS médio de aproximadamente 0,7. Em determinados casos, e. g. em determinadas formas de realização da invenção, o HES tem um PM médio ponderal (PMM) de aproximadamente 500, 550, 600, 650, 750 ou 800 kDa. Em determinados casos, e. g. em determinadas formas de realização da invenção, cerca de 70%, 75%, 80% ou mais das moléculas estão na gama de 20 kDa a 2600 kDa. Em determinados casos, e. g. em determinadas formas de realização da invenção, o MS é aproximadamente 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, ou 0,85.

Ainda noutros casos preferidos, e. g. ainda noutras formas de realização preferidas da invenção, o polissacárido tem um ou mais das características seguintes:

a) o polissacárido é substancialmente solúvel no meio líquido contendo a Enzima Alvo;

b) o polissacárido é substancialmente solúvel no meio líquido contendo a Enzima Alvo e um substrato dessa Enzima Alvo;

c) o polissacárido não é reactivo com a Enzima Alvo (além da promoção da actividade enzimática);

d) o polissacárido não é reactivo com o substrato da Enzima Alvo (à excepção de promover a actividade enzimática quando o substrato é uma Enzima Alvo);

e) o polissacárido é estável à temperatura e/ou pH ao qual a Enzima Alvo é activa ou está a ser utilizada;

f) o polissacárido não está conjugado com a Enzima Alvo;

g) o polissacárido não está conjugado com o substrato da Enzima Alvo;

h) o polissacárido é de origem não animal;

i) o polissacárido compreende pelo menos 2 unidades de monossacárido não idênticas;

j) o polissacárido em combinação com a Enzima Alvo é mantido num estado não congelado durante pelo menos uma parte, de um modo preferido uma parte substancial, da promoção da actividade enzimática pelo polissacárido;

k) o polissacárido em combinação com a Enzima Alvo (e opcionalmente o substrato) não está liofilizado durante pelo menos uma parte, de um modo preferido uma parte substancial, da promoção da actividade enzimática pelo polissacárido; e/ou

1) particularmente no caso de uma Enzima Alvo que é uma proteína terapêutica, o polissacárido é não tóxico para animais e/ou humanos.

Como aqui utilizado, "polissacárido não é reactivo com" uma Enzima Alvo ou substrato inclui mas não está limitado a não inactiva a Enzima Alvo ou substrato, não inibe a Enzima Alvo ou substrato, não dissocia a Enzima Alvo ou substrato, ou não degrada a Enzima Alvo ou substrato.

Utilização dos Polissacáridos

A presente divulgação proporciona métodos para promover a actividade enzimática de uma (uma ou mais) Enzima Alvo, em meio líquido, com um polissacárido(s). Os métodos podem ser realizados a temperaturas à qual uma Enzima Alvo é activa, incluindo mas não estando limitado a entre cerca de: 1 °C a 40 °C, 1 °C a 20 °C, 15 °C a 35 °C, 5 °C a 30 °C, 10 °C a 30 °C, ou 20 °C a 30 °C. Em determinados casos, e. g. em determinadas formas de realização da invenção, os métodos são realizados à temperatura ambiente, i. e., a temperaturas de 25 °C \pm cerca de 5 °C.

Um exemplo de um método da divulgação está representado na Figura 3. Neste exemplo, uma Enzima Alvo e o polissacárido são combinados para formar uma mistura (passo 1) e em seguida mantida durante um intervalo de tempo (passo 2) suficiente para promover a actividade da Enzima Alvo em comparação com a actividade da Enzima Alvo na ausência do polissacárido. Opcionalmente, a mistura pode conter um substrato para a Enzima Alvo. No exemplo opcional, a mistura pode ser mantida durante a

reacção enzimática entre a Enzima Alvo e o substrato. Em tais exemplos, os quais incluem formas de realização da invenção, a Enzima Alvo ou substrato pode estar em solução, imobilizado num suporte sólido ou ambos.

Um exemplo alternativo de um método da divulgação, o qual inclui formas de realização de um método da invenção, está representado na Figura 4. Neste exemplo, numa tal forma de realização, a actividade de uma Enzima Alvo num meio líquido é promovida por um polissacárido na presença de um substrato, em que o substrato está imobilizado num suporte sólido, tal como uma resina empacotada numa coluna. A preparação de uma mistura de Enzima Alvo (processo A) inclui combinar o polissacárido com a Enzima Alvo (passo 1) para preparar uma "mistura," e manter a mistura até à sua utilização (passo 2). É preparada uma composição do substrato (Processo C, passo 9) e mantida até à sua utilização (passo 10). A coluna é opcionalmente equilibrada em primeiro lugar (passo 3) e o substrato é carregado na coluna (passo 4). A mistura de Enzima Alvo é então adicionada à coluna (passo 5) e opcionalmente recirculada através da coluna (passo 6), permitindo que a Enzima Alvo modifique o substrato. Por exemplo, a mistura de Enzima Alvo pode ser recirculada através da coluna durante um intervalo de tempo incluindo mas não estando limitado a desde cerca de 1 a 240 horas, 1 a 40 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 15 a 30 horas, ou 19 a 25 horas. Alternativamente, dependendo da cinética da reacção enzimática, a mistura de Enzima Alvo pode ser recirculada através da coluna durante um intervalo de tempo incluindo mas não estando limitado a desde cerca de: 1-48 horas, 1-24 horas, 1-12 horas, 1-6 horas ou 1-3 horas ou menos de cerca de 1 hora. Uma vez conseguido um nível de modificação desejado, a mistura de Enzima Alvo é de um modo preferido lavada da coluna e o

substrato modificado é eluído e recuperado. Outras variantes deste exemplo/forma de realização também estão no âmbito da divulgação ou invenção, consoante apropriado. Por exemplo, o Processo A pode ser eliminado do exemplo/formas de realização mostrados na Figura 4 e o polissacárido pode ser adicionado directamente à coluna antes, após ou ao mesmo tempo que a Enzima Alvo é adicionada à coluna. Noutros exemplos/formas de realização, o suporte sólido ou resina não está na forma de uma coluna, mas está *e. g.*, na forma de uma suspensão espessa, lote ou outra forma.

Outro aspecto de um método da divulgação, o qual inclui formas de realização do método da invenção, está representado na Figura 5. Neste exemplo, numa tal forma de realização, a actividade enzimática de uma Enzima Alvo em solução é promovida por um polissacárido na presença de um substrato em solução. Em determinados aspectos, a preparação de uma mistura de Enzima Alvo (processo A) inclui combinar o polissacárido com a Enzima Alvo (passo 1) e manter a mistura até à sua utilização (passo 2). No processo C, uma composição do substrato é preparada (passo 7) e mantida até à sua utilização (passo 8). A mistura de Enzima Alvo e a composição do substrato são combinadas (processo B, passo 3) para preparar uma terceira composição compreendendo a Enzima Alvo, o polissacárido e o substrato. A terceira composição é incubada (passo 4) (Nalguns aspectos/formas de realização sob agitação, borbulhar ou agitação suave), permitindo que a Enzima Alvo modifique o substrato. A terceira composição pode ser incubada durante um intervalo de tempo incluindo mas não estando limitado a desde cerca de: 1 a 240 horas, 1 a 40 horas, 40 a 100 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 30 a 60 horas, 15 a 30 horas, ou 19 a 25 horas. Alternativamente, a mistura de Enzima Alvo pode ser incubada

durante um intervalo de tempo incluindo mas não estando limitado a desde cerca de: 1-48 horas, 1-24 horas, 1-12 horas, 1-6 horas ou 1-3 horas ou menos de cerca de 1 hora. Uma vez conseguido um nível de modificação desejado, a Enzima Alvo é separada do substrato modificado (passo 5). Opcionalmente, a extensão da modificação pode ser seguida durante o processo, e. g., removendo uma alíquota da mistura reaccional e determinando o estado de modificação utilizando um método analítico ou ensaio enzimático apropriado (incluindo mas não estando limitado a FACE, ou HPLC com derivatização com ácido antranílico, HPLC, ELISA ou SDS-PAGE).

Outro exemplo de um método da divulgação, o qual inclui formas de realização do método da invenção, está representado na Figura 6. Neste exemplo, numa tal forma de realização, a actividade de uma Enzima Alvo imobilizada num suporte sólido, tal como uma resina empacotada numa coluna, é promovida por um polissacárido na presença de um substrato em solução. A preparação de uma mistura de Enzima Alvo (processo A) inclui combinar o polissacárido com a Enzima Alvo (passo 1) para preparar uma "mistura" e manter a mistura até à sua utilização (passo 2). A composição compreendendo o substrato é preparada (processo C, passo 9) e mantida até à sua utilização (passo 10). Opcionalmente, uma coluna empacotada com uma resina adequada (e. g., uma resina capaz de reter a(s) Enzima(s) Alvo(s) é equilibrada (processo B, passo 3). A mistura de Enzima Alvo é carregada na coluna (passo 4). A composição do substrato é então adicionada à coluna (passo 5) e opcionalmente recirculada através da coluna (passo 6), permitindo que a Enzima Alvo modifique o substrato. A composição do substrato pode ser recirculada através da coluna durante um intervalo de tempo incluindo mas não estando limitado a desde cerca de: 1 a

240 horas, 1 a 40 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 15 a 30 horas ou 19 a 25 horas. Alternativamente, dependendo da cinética da reacção enzimática, o substrato pode ser recirculado através da coluna durante um intervalo de tempo incluindo mas não estando limitado a desde cerca de: 1 a 48 horas, 1 a 24 horas, 1 a 12 horas, 1 a 6 horas, e 1 a 3 horas. Alternativamente, o substrato pode ser recirculado através da coluna durante um intervalo de tempo inferior a cerca de 1 hora. Uma vez conseguido um nível de modificação desejado, o substrato modificado é recuperado (passo 7). Opcionalmente, a Enzima Alvo também pode ser recuperada (passo 8). Outras variantes deste exemplo/forma de realização também estão no âmbito da divulgação ou invenção, consoante apropriado. Por exemplo, o Processo A pode ser eliminado do exemplo/formas de realização mostrados na Figura 6 e o polissacárido pode ser adicionado directamente à coluna antes, após ou ao mesmo tempo que o substrato é adicionado à coluna. Noutros exemplos/formas de realização, o suporte sólido ou a resina não está na forma de uma coluna, mas está e. g., na forma de uma suspensão espessa, lote ou outra forma.

Nos métodos da presente divulgação, a ordem pela qual a Enzima Alvo, o polissacárido e, opcionalmente, o substrato são combinados, não é crítica. Por conseguinte, ainda noutros exemplos da divulgação, e. g., ainda noutras formas de realização da invenção, a Enzima Alvo, o polissacárido e a composição do substrato podem ser adicionados em conjunto ou o polissacárido pode ser adicionado à composição do substrato antes da adição da Enzima Alvo.

Por conseguinte, uma vantagem dos métodos aqui descritos é que permitem utilizar uma menor quantidade da Enzima Alvo em

comparação com a quantidade necessária se a actividade não fosse estimulada.

A presente divulgação proporciona ainda métodos de promoção da actividade enzimática de uma Enzima Alvo (e. g., em meio líquido), compreendendo o método:

(a) combinar uma Enzima Alvo com um polissacárido não natural e opcionalmente um substrato da Enzima Alvo; e

(b) manter, a combinação preparada no passo (a), sem congelar durante um intervalo de tempo: (i) suficiente para promover a actividade da Enzima Alvo em comparação com um controlo adequado, tal como uma actividade da Enzima Alvo na ausência do polissacárido (em comparação com a actividade de uma Enzima Alvo que não foi combinada com o polissacárido não natural); e/ou (ii) suficiente para uma perda substancial de actividade da Enzima Alvo na ausência do polissacárido. Como aqui assinalado, a actividade enzimática e as reacções enzimáticas podem ser medidas por métodos correntes (ver, e. g., Eisenthal *et al.*, *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002 e descrições nos Exemplos).

Os métodos da divulgação podem compreender ainda:

(c) permitir que a Enzima Alvo modifique o substrato, produzindo desse modo um substrato modificado; e

(d) recuperar o substrato modificado.

A divulgação também é dirigida a composições compreendendo substratos modificados ou Enzimas Alvos produzidos pelos métodos aqui descritos.

As associações podem ser mantidas no passo (b) durante pelo menos cerca de: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 22, 24 ou 48 horas, ou pelo menos cerca de: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 20, 30, 40, 50 ou 60 dias, mas menos de 90 dias. Por exemplo, as associações podem ser mantidas durante desde cerca de: 1 a 40 horas, 5 a 35 horas, 10 a 30 horas, 15 a 30 horas, ou 19 a 25 horas. Nalguns aspectos, a combinação pode ser mantida durante desde cerca de: 1 a 90 dias, 1 a 45 dias, 46 a 90 dias, 2 a 60 dias, 2 a 30 dias, 2 a 15 dias ou 2 a 7 dias.

Como assinalado acima, a Enzima Alvo dos métodos aqui pode ser qualquer enzima, por exemplo, uma enzima de oligossacárido/polissacárido incluindo mas não estando limitada àquelas listadas no Quadro 1, uma enzima de proteínas incluindo mas não estando limitado àquelas listadas no Quadro 2 ou uma enzima de polinucleótidos incluindo mas não estando limitado àquelas listadas no Quadro 3, uma lipase, uma hidrolase lisossômica, incluindo mas não estando limitado àquelas listadas no Quadro 4 ou um enzima de molécula pequena.

Como um especialista na técnica entenderá, os substratos cognatos para Enzimas Alvos particulares são bem conhecidas na técnica. Geralmente, sem limitação, um substrato pode ser uma proteína, um péptido, um nucleótido, um lípido, um oligonucleótido ou uma molécula pequena. Por exemplo, nalguns exemplos, o substrato é um proteína terapêutica. Por exemplo, nalguns exemplos preferidos, o substrato pode ser uma enzima ERT incluindo, mas não estando limitadas àquelas listadas no

Quadro 4. Num exemplo preferido, e. g. numa forma de realização preferida da invenção, (1) as Enzimas Alvos são sialidase, β -galactosidase e β -N-acetil-hexosaminidase; (2) o amido é HES; e (3) o substrato é β -glucocerebrosidase.

A divulgação proporciona ainda métodos de promoção da actividade enzimática de enzimas que modificam oligossacáridos. Por exemplo, num caso, o método compreende combinar uma ou mais enzimas (e. g., enzimas de modificação de oligossacáridos) que modificam a β -glucocerebrosidase com cerca de 3% até cerca de 7% de HES, produzindo desse modo uma combinação. A combinação é mantida sob condições em que a actividade da uma ou mais enzimas é promovida (melhorada) quando em comparação com um controlo adequado (e. g., em comparação com a actividade da uma ou mais enzimas de modificação de oligossacáridos que não foi combinada com cerca de 3% até cerca de 7% de HES). A extensão da modificação desses oligossacáridos pode ser medida por métodos correntes tal como métodos de HPLC com derivatização com ácido antranílico ou electroforese de hidratos de carbono assistida com fluoróforo (FACE) (ver, e. g., Eisenthal et al., *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002 e descrições nos Exemplos).

Num exemplo específico, o método compreende:

(a) combinar a β -glucocerebrosidase com uma ou mais enzimas de modificação de oligossacáridos e com cerca de 3% até cerca de 7% de HES, produzindo desse modo uma combinação; e

(b) manter a combinação sob condições em que as enzimas de oligossacárido/polissacárido modificam a β -glucocerebrosidase na presença do HES, produzindo desse modo β -glucocerebrosidase

modificada. O método pode compreender ainda a recuperação da β -glucocerebrosidase modificada.

Nalguns casos, a divulgação proporciona um método de promoção da actividade enzimática de uma Enzima Alvo durante o fabrico de uma Enzima Alvo e/ou substrato, incluindo mas não estando limitado a uma enzima de oligossacárido/polissacárido ou uma hidrolase lisossómica.

A divulgação proporciona ainda um método de promoção da actividade enzimática de uma Enzima Alvo durante um ou mais passos de purificação da Enzima Alvo e/ou substrato. Um número de passos de purificação são conhecidos na técnica (ver, e. g., *Scopes Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª ed., Springer-Verlag: Nova Iorque, 1994; *Abelson et al., Guide to Protein Purification*, Academic Press: Nova Iorque, 1990; *Roe Protein Purification Techniques: A Practical Approach*, 2ª ed., Oxford University Press: Nova Iorque, 2001). A pureza pode ser avaliada por qualquer método adequado, incluindo mas não estando limitado a SDS-PAGE, electroforese capilar ou HPLC.

Num exemplo particular, a divulgação é dirigida a um método de promoção da actividade enzimática de uma ou mais enzimas (e. g., enzimas de oligossacárido/polissacárido) que modificam a β -glucocerebrosidase. Por exemplo, os métodos aqui descritos podem ser utilizados para promover a actividade enzimática de sialidase, β -galactosidase e/ou β -hexosaminidase durante a purificação da β -glucocerebrosidase (e. g., a partir de células recombinantes). Neste exemplo, o método compreende combinar a β -glucocerebrosidase; uma enzima de oligossacárido/polissacárido seleccionada do grupo consistindo de: sialidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase e uma combinação das mesmas; e

cerca de 3% até cerca de 7% de HES, produzindo desse modo uma combinação. A combinação é mantida sob condições em que a actividade enzimática de sialidase, β -galactosidase e/ou β -hexosaminidase é promovida (e. g., em comparação com um controlo adequado) e em que as enzimas modificam a β -glucocerebrosidase na presença de HES. É desse modo produzida a β -glucocerebrosidase modificada e o método pode compreender ainda a recuperação da β -glucocerebrosidase modificada.

Os métodos aqui descritos também podem ser utilizados para estabilizar a Enzima Alvo de forma a que ela possa actuar num substrato, compreendendo combinar o substrato, uma Enzima Alvo que remodela o substrato e cerca de 0,1% a cerca de 55% p/v de um não polissacárido não natural, produzindo desse modo uma combinação. A combinação é mantida sob condições em que ocorre alteração enzimática do substrato pela Enzima Alvo na presença do polissacárido não natural. Num exemplo particular, a divulgação proporciona um método de modificar enzimaticamente um oligossacárido de um substrato (e. g., β -glucocerebrosidase) por uma enzima de oligossacárido/polissacárido (e. g., sialidase, β -galactosidase e/ou β -hexosaminidase) compreendendo combinar o substrato, a enzima e cerca de 0,1% a cerca de 15% p/v de um polissacárido não natural, produzindo desse modo uma combinação. A combinação é mantida sob condições em que ocorre remodelação do substrato pela enzima na presença do polissacárido não natural.

Composições Adicionais

A presente divulgação também proporciona uma composição compreendendo (a) uma Enzima Alvo seleccionada do grupo

consistindo de uma enzima de oligossacárido/polissacárido, uma enzima de proteínas, uma enzima de polinucleótidos, uma lipase, uma cinase e uma hidrolase lisossômica, e (b) um polissacárido não natural, em que a composição compreende desde cerca de 0,01% a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01 até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% do polissacárido. Nalguns casos, a Enzima Alvo é ela mesmo uma proteína terapêutica.

A presente divulgação proporciona ainda uma composição compreendendo (a) uma Enzima Alvo purificada, (b) um polissacárido não natural e (c) um substrato da enzima, em que a composição compreende desde cerca de 0,01% a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01% até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% p/v do polissacárido.

A presente divulgação proporciona ainda uma composição compreendendo (a) uma ou mais enzimas de oligossacárido/polissacárido e (b) desde cerca de 0,01% a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01% até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% p/v de HES. A enzima de oligossacárido/polissacárido é mantida na presença de HES e a actividade dessa enzima de oligossacárido/polissacárido é medida

ao longo do tempo colhendo amostras e determinando a actividade enzimática para um substrato apropriado. Noutro exemplo, a divulgação proporciona uma composição compreendendo (a) uma ou mais enzimas de oligossacárido/polissacárido, (b) desde cerca de 0,01% a 55% p/v, cerca de 0,1% a 50% p/v, cerca de 1% a 50% p/v, cerca de 5% a 40% p/v, cerca de 10% a 40% p/v, cerca de 15% a 35% p/v, cerca de 20% a 30% p/v, cerca de 0,01% até cerca de 15% p/v, cerca de 0,1% a 15% p/v, cerca de 1% a 10% p/v, cerca de 5% a 15% p/v, cerca de 3% a 7% p/v ou cerca de 4% a 6% p/v de HES, e (c) um substrato da enzima.

Outras associações ilustrativas, não limitativas são mostradas no Quadro 5.

Quadro 5: Associações Ilustrativas

Enzima Alvo	Polissacárido	Presente Substrato
Qualquer	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll®	Sim
Qualquer	Hidroxialquilamido	Sim
Qualquer	HES	Sim
Enzima de modificação de açúcar	Qualquer	Sim
Enzima de modificação de açúcar	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll®	Sim
Enzima de modificação de açúcar	Hidroxialquilamido	Sim
Enzima de modificação de açúcar	HES	Sim
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	Qualquer	Sim

(continuação)

Enzima Alvo	Polissacárido	Presente Substrato
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Sim
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	Hidroxiálquilamido	Sim
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	HES	Sim
Uma hidrolase lisossômica	Qualquer	Sim
Uma hidrolase lisossômica	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Sim
Uma hidrolase lisossômica	Hidroxiálquilamido	Sim
Uma hidrolase lisossômica	HES	Sim
β -Glucocerebrosidase	Qualquer	Sim
β -Glucocerebrosidase	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Sim
β -Glucocerebrosidase	Hidroxiálquilamido	Sim
β -Glucocerebrosidase	HES	Sim
α -glucosidase	Qualquer	Sim
α -glucosidase	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Sim
α -glucosidase	Hidroxiálquilamido	Sim
α -glucosidase	HES	Sim
Agalsidase beta	Qualquer	Sim
Agalsidase beta	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Sim
Agalsidase beta	Hidroxiálquilamido	Sim
Agalsidase beta	HES	Sim
Qualquer	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não

(continuação)

Enzima Alvo	Polissacárido	Presente Substrato
Qualquer	Hidroxiálquilamido	Não
Qualquer	HES	Não
Enzima de modificação de açúcar	Qualquer	Não
Enzima de modificação de açúcar	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não
Enzima de modificação de açúcar	Hidroxiálquilamido	Não
Enzima de modificação de açúcar	HES	Não
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	Qualquer	Não
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	Hidroxiálquilamido	Não
Sialidase, β -galactosidase ou β -N-acetil-hexosaminidase	HES	Não
Uma hidrolase lisossômica	Qualquer	Não
Uma hidrolase lisossômica	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não
Uma hidrolase lisossômica	Hidroxiálquilamido	Não
Uma hidrolase lisossômica	HES	Não
β -Glucocerebrosidase	Qualquer	Não
β -Glucocerebrosidase	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não
β -Glucocerebrosidase	Hidroxiálquilamido	Não
β -Glucocerebrosidase	HES	Não

(continuação)

Enzima Alvo	Polissacárido	Presente Substrato
α -glucosidase	Qualquer	Não
α -glucosidase	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não
α -glucosidase	Hidroxiálquilamido	Não
α -glucosidase	HES	Não
Agalsidase beta	Qualquer	Não
Agalsidase beta	Um amido quimicamente modificado ou Ficoll [®]	Não
Agalsidase beta	Hidroxiálquilamido	Não
Agalsidase beta	HES	Não

A divulgação proporciona ainda uma composição farmacêutica compreendendo uma Enzima Alvo e um polissacárido não natural em que a composição compreende desde cerca de 0,01% a cerca de 55% p/v do polissacárido. Noutro exemplo, a composição farmacêutica compreende substratos que podem eles mesmos ser enzimas, incluindo hidrolases lisossômicas produzidas de acordo com tais métodos, e métodos de utilização das mesmas. Em exemplos ilustrativos, a divulgação proporciona composições farmacêuticas, compreendendo hidrolases lisossômicas, incluindo, e. g., β -glucocerebrosidase, produzidas de acordo com os métodos das invenções. As formulações farmacêuticas e excipientes aceitáveis são conhecidos (ver, e. g., 2005 *Physicians' Desk Reference*[®], Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a ed., Gennado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000; *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5^a ed., Rowe, R., et al., 2005; Kibbe, A.H. (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*,

3^a ed., Washington, D.C., American Pharmaceutical Association; M.F. Powell, *et al.*, *PDA Journal of Pharm. Sci. Tech.*, 52:238-311 (1998); S. Neema, *et al.*, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; J. Swarbick e J.C. Boylan eds., M. Dekker (2002)).

As composições farmacêuticas da divulgação incluem opcionalmente um ou mais veículos, diluentes, excipientes, enchimentos e/ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis (e. g., lactose, celulose, dextrose), que são "aceitáveis" no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes das composições farmacêuticas e não prejudiciais para a composição ou o receptor da composição. As composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas numa forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer método adequado conhecido do especialista. Em geral, as composições farmacêuticas são preparadas pondo em combinação a Enzima Alvo, o polissacárido não natural e/ou o substrato com o veículo, diluente, excipiente, enchimento e/ou estabilizante e, em seguida, se for necessário, dividindo o produto em dosagens unitárias do mesmo.

As composições farmacêuticas podem ser formuladas, por exemplo, como uma saqueta, suspensão espessa, trocisco, elixir, suspensão, líquido ou comprimido. Em exemplos particulares, as composições farmacêuticas são formuladas para injeção. Por exemplo, as composições farmacêuticas são formuladas para injectáveis líquidos (frasco, seringa pré-cheia), injectáveis liofilizados (frasco, seringa de câmara dupla), administração por inalação (micropartículas, nebulizada), formulações orais e injectáveis de libertação prolongada, colírios e/ou administração intranasal (líquida). Num exemplo, a composição farmacêutica compreende a Enzima Alvo e o polissacárido não natural num veículo líquido (e. g., água). A composição

farmacêutica pode compreender opcionalmente um conservante farmacêuticamente aceitável (e. g., álcool benzílico; fenol). Num exemplo particular, a composição farmacêutica compreende uma Enzima Alvo que foi solubilizada ou ressolubilizada (tal como ressolubilização de um produto liofilizado) num líquido compreendendo um polissacárido não natural.

A divulgação proporciona ainda métodos de tratamento de um distúrbio de depósito lisossómico, tal como um LSD listado no Quadro 4 (e. g., doença de Gaucher), compreendendo administrar a um indivíduo necessitado do mesmo (e. g., um mamífero, tal como um humano), uma composição farmacêutica da divulgação. A administração não está limitada a qualquer sistema de administração particular e pode incluir, sem limitação, intravenosa, parentérica (incluindo injeção subcutânea, intramedular, intra-articular, intramuscular ou intraperitoneal), transdérmica ou oral (por exemplo, em cápsulas, suspensões ou comprimidos e meios e dispositivos de administração prolongada). A administração a um indivíduo pode ocorrer numa única dose ou em administrações repetidas, e em qualquer de uma variedade de formas de sal fisiologicamente aceitáveis e/ou com um veículo e/ou aditivo farmacêuticamente aceitável como parte de uma composição farmacêutica (aqui descrita).

As composições aqui podem ser administradas como uma dose de aproximadamente desde 1 µg/kg a 80 mg/kg de ingrediente activo, dependendo da gravidade dos sintomas e da progressão da doença. Alternativamente é administrada uma dose de aproximadamente desde 0,01 Unidades por quilograma de peso corporal do doente (U/kg) a 1000 U/kg. Pode ser utilizado qualquer meio de administração conhecido na técnica para

administrar as composições da divulgação. Muito geralmente, os compostos proteicos são administrados em ambulatório por administração diária, semanal, bissemanal, mensal ou bimensal. Determinadas composições podem ser administradas apenas algumas vezes ou apenas uma vez. A dose terapeuticamente eficaz apropriada de um composto é aproximadamente desde cerca de 1 µg/kg a 80 mg/kg, desde cerca de 1 µg/kg a 25 mg/kg desde cerca de 1 µg/kg a 10 mg/kg, desde cerca de 1 µg/kg a 1 mg/kg, desde cerca de 10 µg/kg a 1 mg/kg, desde cerca de 10 µg/kg a 100 µg/kg, desde cerca de 100 µg a 1 mg/kg, ou desde cerca de 500 µg/kg a 15 mg/kg. Alternativamente, a dose terapeuticamente eficaz apropriada de uma enzima é aproximadamente: desde cerca de 0,1 U/kg a 200 U/kg, desde cerca de 5 U/kg a 300 U/kg, desde cerca de 10 U/kg a 100 U/kg, desde cerca de 100 U/kg a 500 U/kg, desde cerca de 5 U/kg a 50 U/kg, desde cerca de 500 U/kg a 2000 U/kg, ou desde cerca de 1000U/kg a 2500U/kg. Adicionalmente, dosagens específicas são indicadas em *Physicians' Desk Reference*[®].

Por exemplo, num exemplo, a β-glucocerebrosidase produzida pelos métodos da divulgação, e. g., utilizando os métodos da invenção, pode ser administrada a um indivíduo por infusão intravenosa (IV). Por exemplo, os regímenes de dosagem iniciais, os quais podem ser ajustados por um clínico com base na gravidade da doença, podem compreender doses únicas ou múltiplas por semana de cerca de 1 U/kg a 5U/kg de peso corporal ou aproximadamente doses bissemanais de cerca de 30-100 U/kg de peso corporal, em que uma unidade (U) de GCR é definida como a quantidade de GCR que catalisa a hidrólise de 1 µmol de p-nitrofenil-β-D-glucopiranósido por minuto a 37 °C. A infusão IV é geralmente ao longo de 1-2 horas.

Por exemplo, noutro exemplo, a α -galactosidase produzida pelos métodos da divulgação, e. g. utilizando os métodos da invenção, pode ser administrada a um indivíduo por infusão intravenosa (IV). Por exemplo, os regímenes de dosagem iniciais, os quais podem ser ajustados por um clínico com base na gravidade da doença, podem compreender doses únicas ou múltiplas por semana de cerca de 0,3-3,0 mg/kg. A infusão IV é geralmente ao longo de 1-2 horas. Em relação à α -galactosidase, uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 μ mol de *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido por minuto a 37 °C.

Ainda noutro exemplo, a α -glucosidase produzida pelos métodos da divulgação, e. g. utilizando os métodos da invenção, pode ser administrada a um indivíduo por infusão intravenosa (IV). Por exemplo, regímenes de dosagem iniciais, os quais podem ser ajustados por um clínico com base na gravidade da doença, podem compreender doses únicas ou múltiplas por semana de cerca de 20 mg/kg até cerca de 40 mg/kg numa administração bimensal. A infusão IV é geralmente ao longo de 4-7 horas. Em relação à α -glucosidase, uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 μ mol de *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido por minuto a 37 °C.

Ensaio para Avaliar a Actividade Enzimática da Enzima Alvo

A actividade enzimática de uma Enzima Alvo pode ser avaliada por um ensaio apropriado determinado por um especialista na técnica (ver, e. g., Eienthal *et al.*, *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002; Freifelder, D., *Physical Biochemistry*;

Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2ª Ed., W. H. Freeman & Co., Nova Iorque, 1982 e descrições no Exemplos).

Por exemplo, o estado de modificação de um substrato ou a extensão de uma reacção enzimática contendo uma Enzima Alvo ou a actividade de uma Enzima Alvo pode ser medida por ensaios conhecidos na técnica, incluindo mas não estando limitado a electroforese, cromatografia, métodos imunológicos, métodos hidrodinâmicos, métodos espectroscópicos ou outro método), ver e. g., Freifelder, D., *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2ª Ed., W. H. Freeman & Co., Nova Iorque, 1982; ver também, Eisenthal *et al.*, *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002. Noutros casos, e. g. noutras formas de realização da invenção, a extensão da modificação pode ser determinada durante ou após o processo, e. g., por amostragem da mistura reaccional e análise do estado de modificação do substrato utilizando um método analítico apropriado (incluindo mas não estando limitado a FACE, HPLC ou SDS-PAGE, ou um ensaio assinalado acima). A selecção do ensaio apropriado a ser utilizado em conjunto com a Enzima Alvo particular também pode ser determinada por um técnico médio na matéria através de experiências simples e de rotina.

Exemplificação

Informação geral:

Nos Exemplos abaixo, salvo indicação em contrário, foi utilizado hidroxietilamido (HES) de B. Braun. O HES de B. Braun tem um peso molecular médio (PMM) indicado na gama de

450-700 kDa, com uma substituição molar de (hidroxietilo) (MS) de 0,70-0,80. A comparação de duas fontes adicionais de HES (obtido de Ajinomoto e Fresenius Kabi) para promover a actividade da Enzima Alvo é mostrada no Exemplo 11.

Nos Exemplos 1-9 são utilizados vários lotes de Enzimas Alvos. A actividade de cada uma das soluções-mães das três Enzimas Alvos (sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase) foi medida como descrito abaixo. As unidades (U) de cada uma das três Enzimas Alvos adicionadas à reacção de oligossacárido/polissacárido de β -glucocerebrosidase (GCR) foram calculadas a partir dessa medição. Nestes Exemplos, a GCR é utilizada como um substrato enzimático para as enzimas de oligossacárido/polissacárido (*i. e.*, Enzimas Alvos): sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase.

Ensaio Face

O ensaio de electroforese de hidratos de carbono assistida com fluoróforo (FACE) (ver, *e. g.*, Jackson, *Biochem. Soc. Trans.* 21:121-5 (1993); Hu, *J. Chromatogr. A* 705:89-103 (1995); Friedman *et al.*, *Anal. Biochem.* 228:221-225 (1995); Starr *et al.*, *J. Chromatogr. A* 720:295-321 (1996)) é um ensaio padrão para caracterizar e medir oligossacáridos. Também pode ser utilizado para caracterizar monossacáridos (Gao *et al.*, *Glycobiology* 13:1G-3G (2003)).

O ensaio FACE é um método de seguimento preferido da actividade enzimática das enzimas de oligossacárido/polissacárido (tais como as Enzimas Alvos em determinados Exemplos aqui) determinando a extensão da

modificação de um substrato (incluindo, mas não estando limitado a, uma proteína, glicoproteína ou oligossacárido) da(s) Enzima(s) Alvo(s). Utilizando um ensaio FACE, um número FACE mais elevado é indicativo de um maior grau de modificação e um maior grau de actividade da(s) Enzima(s) Alvo(s). Os ensaios FACE são conhecidos na técnica.

Resumidamente, quando o oligossacárido a ser ensaio é de uma glicoproteína, o oligossacárido é inicialmente dissociado da proteína (e. g., por tratamento com *N*-glicanase para libertar um oligossacárido ligado por *N* intacto, por tratamento com *O*-glicanase para libertar um oligossacárido ligado por *O* intacto, ou por tratamento com endo- β -*N*-acetilglucosaminidase H para libertar um oligossacárido ligado por *N* do tipo alto teor em manose intacto (Turner *et al.* *Glycosylation and Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchors*. Em *Regulatory Protein Modification*, Hemmings, Ed., Humana Press: Totawa, NJ, 1997).

As cadeias de oligossacárido intactas são em seguida marcadas com um fluoróforo, tal como 8-amino-naftaleno-1,3,6-trissulfonato dissódico (ANTS), 2-aminoacridona (AMAC), 7-amino-1,3-naftalenodissulfonato de potássio (ANDA) e 4-amino-naftalenossulfonato de sódio (ANSA), por aminação redutiva de uma amina primária do fluoróforo com a extremidade de redução de um oligossacárido na presença de cianoboro-hidreto de sódio. O fluoróforo pode estar carregado negativamente (por exemplo, devido a sulfatação, como nos exemplos não limitativos, utilizando ANTS, ANDA, ANSA).

Os oligossacáridos marcados com fluoróforo são em seguida separados por electroforese num gel de poliacrilamida de alta

percentagem. A carga necessária para migração num campo eléctrico é proporcionada pela estrutura química intrínseca do oligossacárido (como, por exemplo, nos oligossacáridos compreendendo ácido siálico ou monossacáridos fosforilados ou sulfatados) ou pelo fluoróforo.

O gel resultante é em seguida visualizado utilizando uma caixa de UV de comprimento de onda longínquo, e as várias bandas são identificadas e a sua fluorescência quantificada. Os oligossacáridos podem ser quantificados a concentrações tão diluídas quanto a gama baixa dos picomoles por este método (Starr *et al.*, *J. Cromatogr. A* 720:295-321 (1996)).

Nos Exemplos aqui, quando as Enzimas Alvos foram as sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase, foi utilizado um ensaio FACE para determinar a percentagem de espécies de oligossacárido modificadas no substrato GCR. Especificamente, a GCR foi tratada com *N*-glicanase (aproximadamente 8 U de *N*-glicanase por 40 μ g de GCR) para libertar as cadeias de oligossacárido ligado por *N* intactas. Os oligossacáridos libertados foram em seguida marcados com o fluoróforo: ANTS (ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trissulfónico e separados num gel de caracterização do perfil de oligossacáridos (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Um padrão de referência em escada de dextrano (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA) também foi analisado no gel juntamente com os oligossacáridos de referência, $\text{GlcNAc}_2(+\text{Fuc})\text{Man}_3$ e $\text{GlcNAc}_2(-\text{Fuc})\text{Man}_3$, Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA). As bandas no gel foram em seguida quantificadas varrendo o gel em relação à fluorescência utilizando um sistema de imagens SE2000 com software de imagiologia de fluorescência (Glyko®/Prozyme®, San Leandro, CA).

A proporção (%) da intensidade de fluorescência das bandas que representam duas estruturas nucleares, $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})\text{Man}_3$ e $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ (estruturas nucleares), relativamente à intensidade total das bandas com mobilidade $\leq \text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ numa dada pista proporcionou a percentagem de GCR modificada. Uma vez que a GCR actua como um substrato para as três Enzimas Alvos, sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase, os resultados da FACE correlacionam com a actividade das Enzimas Alvos contra a GCR. Para a GCR, os valores de FACE podem variar desde cerca de 0 a cerca de 100%, cerca de 3% até cerca de 90% e cerca de 6% a cerca de 85%.

Medição da Actividade da Enzima Alvo & Determinação das Unidades/mL de Enzima Alvo

A actividade enzimática de uma Enzima Alvo pode ser avaliada por um ensaio apropriado determinado por um especialista na técnica (ver, e. g., Eienthal *et al.*, *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nova Iorque, 2002 e descrições nos Exemplos).

A actividade enzimática das três Enzimas Alvos utilizadas nos Exemplos apresentados abaixo são descritas nos seis parágrafos seguintes.

Ensaio de Actividade de β -Glucocerebrosidase (GCR):

A actividade da β -glucocerebrosidase (β -D-glucosidase) de soluções-mães foi avaliada medindo a velocidade de hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNP- β Glc)

(Sigma Aldrich, St. Louis, MO) em *p*-nitrofenol (pNP). Nestes ensaios, 80 µL de pNP-βGlc a 10 mM foram adicionados a 20 µL da amostra de β-glucosidase e a amostra foi incubada a 37 °C durante quinze minutos. Depois de a reacção ter sido desactivada com 800 µL de glicina 0,1 M, pH 10,5, foi medida a absorvância da amostra a 400 nm. A actividade da amostra de β-glucosidase foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(A_{400}) * (\text{factor de diluição da amostra}) * (\text{volume total da amostra de ensaio})}{\epsilon * (\text{tempo}) * (\text{percurso óptico}) * (\text{volume da amostra})}$$

em que A_{400} é a absorvância da amostra a 400 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar de pNP a 400 nm, o tempo é medido em minutos, o percurso óptico é um cm e o volume de amostra é medido em mL.

Ensaio de Actividade de α-Glucosidase:

A actividade da α-glucosidase (α-D-glucosidase) de soluções-mães foi avaliada medindo a velocidade de hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranosido (pNP-αGlc) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) em *p*-nitrofenol (pNP). Nestes ensaios, 225 µL de pNP-αGlc a 40 mM foram adicionados a 25 µL da amostra de α-glucosidase e a amostra foi incubada a 37 °C durante quinze minutos. Depois de a reacção ter sido desactivada com 0,25 mL de glicina 0,3 M, pH 10,6, foi medida a absorvância da amostra a 400 nm. A actividade da amostra de α-glucosidase foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(A_{400}) * (\text{factor de diluição da amostra}) * (\text{volume total da amostra de ensaio})}{\epsilon * (\text{tempo}) * (\text{percurso óptico}) * (\text{volume da amostra})}$$

em que A_{400} é a absorvância da amostra a 400 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar de pNP a 400 nm, o tempo é medido em minutos, o percurso óptico é um cm e o volume de amostra é medido em mL.

Ensaio de Actividade de α -Galactosidase:

A actividade da α -galactosidase (α -D-galactosidase) de soluções-mães foi avaliada medindo a velocidade de hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (pNP- α Gal) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) em *p*-nitrofenol (pNP). Nestes ensaios, 75 μ L de pNP- α Gal a 30 mM foram adicionados a 175 μ L da amostra de α -galactosidase e a amostra foi incubada a 37 °C durante dez minutos. Depois de a reacção ter sido desactivada com 0,25 mL de borato de sódio 0,5 M, pH 9,0, foi medida a absorvância da amostra a 405 nm. A actividade da amostra de α -galactosidase foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(\Delta\text{OD da Amostra}) * (\text{factor de diluição}) * (\text{conc. padrão pNP}) * (\text{volume total de ensaio})}{(\text{tempo}) * (\Delta\text{OD padrão}) * (\text{volume da amostra})}$$

em que ΔOD é a diferença na absorvância da amostra (ou padrão) e do branco a 405 nm, o tempo é medido em minutos e o volume de amostra é medido em mL.

Ensaio de Actividade da Sialidase (neuraminidase):

A actividade da Sialidase (neuraminidase) de soluções-mães foi determinada medindo a velocidade da hidrólise, catalisada por sialidase, do substrato sintético ácido 4-metilumbeliferil-

N-acetilneuramínico (4MU-NANA) (Sigma Aldrich Company, St. Louis, MO) em 4-metilumbeliferona (4MU). Nestes ensaios, 100 µL de 4MU-NANA a 5- 10 uM foram adicionados a 10 µL de sialidase purificada. Após quinze minutos, a reacção foi desactivada adicionando 5 mL de glicina 0,1 M, pH 10,5, e 1,5 mL da amostra foram analisados com um fluorómetro (excitação 360 nm, emissão 450 nm). Os resultados foram extrapolados para uma curva padrão gerada com solução de 4MU para determinar a quantidade de 4MU libertada durante a incubação. A actividade foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(\text{4MU libertada}) \cdot (\text{factor de diluição da amostra})}{(\text{volume da amostra}) \cdot (\text{tempo}) \cdot 1000}$$

em que a quantidade de 4MU libertada é medida em nmol, o volume de amostra é medido em mililitros (mL) e o tempo é medido em minutos. Assim, por exemplo, utilizando o cálculo acima, se for determinado que uma solução-mãe de enzima tem uma actividade de 1000 Unidades/mL e se pretender utilizar 2000 Unidades de enzima numa reacção enzimática, essa reacção precisaria de 2 mL dessa solução-mãe.

Ensaio de Actividade da β-Galactosidase:

A actividade da β-galactosidase (β-D-galactosidase) de soluções-mães foi avaliada medindo a velocidade de hidrólise do substrato sintético o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido (oNPGal) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) em o-nitrofenol (oNP). Nestes ensaios, 400 µL de oNPGal a 15 mM foram adicionados a 100 µL da amostra de β-galactosidase e a amostra foi incubada a 37 °C

durante quinze minutos. A reacção foi então desactivada pela adição de 2,5 mL de glicina 0,1 M, pH 10,5, e foi medida a absorvância da amostra a 430 nm. A actividade da amostra de β -galactosidase foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(A_{430}) * (\text{factor de diluição da amostra}) * (\text{volume total da amostra de ensaio})}{\epsilon * (\text{tempo}) * (\text{percurso óptico}) * (\text{volume da amostra})}$$

em que A_{430} é a absorvância da amostra a 430 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar de oNP a 430 nm, o tempo é medido em minutos, o percurso óptico é um cm e o volume de amostra é medido em mL.

Ensaio de Actividade da β -Hexosaminidase:

A actividade da β -Hexosaminidase (β -N-acetilglucosaminidase) de soluções-mães foi avaliada medindo a velocidade de hidrólise, catalisada por β -hexosaminidase, do substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-N-acetilglucosaminida (pNPGlcNAc) (Sigma Chemical, St Louis, MO) em *p*-nitrofenol (pNP). Nestes ensaios, 400 μ L de pNPGlcNAc a 4 mM foram adicionados a 100 μ L da amostra de β -hexosaminidase. A amostra foi incubada a 37 °C durante quinze minutos. Depois de a reacção ter sido desactivada com 2,5 mL de glicina 0,1 M, pH 10,5, foi medida a absorvância da amostra a 400 nm. A actividade da amostra de β -hexosaminidase foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(A_{400}) * (\text{factor de diluição da amostra}) * (\text{volume total da amostra de ensaio})}{\epsilon * (\text{tempo}) * (\text{percurso óptico}) * (\text{volume da amostra})}$$

em que A_{400} é a absorvância da amostra a 400 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar de pNP a 400 nm, o tempo é medido em minutos, o percurso óptico é um cm e o volume de amostra é medido em mL.

Como aqui utilizado, "sv" significa o volume do sistema utilizado (e. g., no caso de uma coluna, sv refere-se ao volume do leito de resina mais o volume contido nas tubagens associadas à coluna; no caso de um lote, o volume do sistema refere-se ao volume total do lote). "U/L sv" refere-se às unidades de enzima por litro de volume do sistema. "% p/L sv" refere-se à percentagem em peso por litro de volume do sistema.

Exemplo 1 : Efeito de HES na Estabilidade de GCR

Foi realizado um estudo para avaliar o efeito do HES na Enzima Alvo β -glucocerebrosidase sob condições destinadas a promover uma perda de actividade enzimática da Enzima Alvo na ausência de um estabilizante, tal como HES (i. e., enzima em stress). Especificamente, a GCR a uma concentração de 4 mg/mL em Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,5 foi preparada em soluções de 0%, 10% ou 40% de HES adicionando os volumes apropriados de uma solução-mãe de HES a 50%. As preparações foram incubadas a 40 °C durante os tempos indicados e, em seguida, foram colhidas amostras e congeladas a -80 °C. As amostras foram descongeladas para análise da actividade da β -glucocerebrosidase. O Quadro 6 mostra a actividade enzimática ao longo do tempo. A Figura 7 mostra a actividade em pontos no tempo como uma percentagem da actividade inicial (T0; 0 h).

Quadro 6: Efeito de HES na Promoção da Actividade da GCR

Estudo GCR HES	Actividade (U/mL)		
	0% de HES	10% de HES	40% de HES
Tempo (horas)			
0	120,83 ± 3,76	118,59 ± 7,12	70,23 ± 8,05
1	45,23 ± 0,62	62,37 ± 1,15	94,69 ± 2,36
2	17,00 ± 0,13	29,88 ± 1,34	82,27 ± 3,80
3	7,64 ± 0,55	13,76 ± 0,6	69,15 ± 7,96
4	1,73 ± 0,02	6,07 ± 0,15	59,32 ± 2,39
6	0,57 ± 0,03	2,16 ± 0,08	51,30 ± 3,45
22	0,14 ± 0,01	0,32 ± 0,02	23,07 ± 0,01
48	0,09 ± 0,00	0,18 ± 0,00	20,72

Médias e desvios padrão de ensaios de actividade realizados sobre amostras em duplicado.

Os dados no Quadro 6 indicam que a Enzima Alvo, GCR contendo 0% e 10% de HES perdeu >95% da sua actividade sob condições de stress durante 6 horas a 40 °C. Em contrapartida, a amostra contendo 40% de HES manteve >50% da actividade inicial no mesmo intervalo de tempo sob as mesmas condições de stress. Estes dados mostram que a Enzima Alvo, GCR, é estabilizada pela presença do polissacárido HES.

Exemplo 2 Efeito de HES na Estabilidade de α -glucosidase

Foi realizado um estudo para avaliar o efeito do HES na Enzima Alvo α -glucosidase. A α -glucosidase purificada foi preparada em condições destinadas a promover um perda de actividade enzimática da Enzima Alvo na ausência de um estabilizante tal como HES. Especificamente, a enzima foi

preparada em Acetato de Sódio 50 mM, pH 4,0 e em seguida foram preparadas soluções contendo 0%, 10% e 40% de HES e α -glucosidase adicionando os volumes apropriados de uma solução-mãe de HES a 50%. As soluções foram incubadas a 40 °C, e foram colhidas amostras nos pontos no tempo indicados e, em seguida, congeladas a -80 °C. As amostras foram descongeladas e analisadas quanto à actividade da α -glucosidase. O Quadro 7 mostra a actividade medida nas várias amostras ao longo do intervalo de tempo de 0-20 dias. A Figura 8 mostra a actividade em pontos no tempo como uma percentagem da actividade inicial (T0; Tempo zero).

Quadro 7: Efeito do HES na Promoção da Actividade da α -glucosidase

Estudo α Glu HES	Actividade (U/mL)		
	0% de HES	10% de HES	40% de HES
Tempo (Dia)			
0	5,91 \pm 0,46	18,36 \pm 0,27	14,72 \pm 0,71
1	4,78 \pm 0,06	15,49 \pm 0,18	15,58 \pm 0,12
4	0,79 \pm 0,01	10,0 \pm 0,01	13,95 \pm 0,01
6	0,57 \pm 0,00	6,93 \pm 0,17	13,54 \pm 0,22
8	0,43 \pm 0,01	5,71 \pm 0,29	13,37 \pm 0,54
11	0,06 \pm 0,02	4,69 \pm 0,12	14,89 \pm 0,49
20	nd	1,92 \pm 0,02	12,85 \pm 0,26

nd - sem dados

médias e desvios padrão de ensaios de actividade realizados sobre amostras em duplicado.

Era esperado que uma solução de partida da Enzima Alvo α -glucosidase, antes da preparação do tampão em tampão a pH 4,0, tivesse cerca de 16 U/mL. No processo de preparação das amostras

a pH 4,0 (~30 min a 1 h), a amostra de controlo, 0% de HES, apresentou uma diminuição de cerca de 63% da sua actividade de α -glucosidase inicial esperada. As amostras em 10% e 40% de HES não experimentaram esta perda de actividade. Apenas cerca de 10% da actividade remanescente na amostra de 0% de HES foi demonstrada pelo dia 4. A amostra de 10% de HES manteve cerca de 55% da sua actividade durante o mesmo intervalo de tempo e a amostra de 40% de HES manteve essencialmente toda a actividade ao longo de todo o estudo (20 dias). Estes dados mostram que a α -glucosidase é estabilizada pela presença de HES.

Exemplo 3: Efeito de HES na Promoção da Estabilidade de α -galactosidase

A Enzima Alvo, α -galactosidase, foi preparada à mesma concentração de proteína em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 contendo 0%, 10% ou 40% de HES. As preparações foram incubadas a 40 °C durante os tempos indicados e, em seguida, foram colhidas amostras e congeladas a -80 °C. As amostras foram descongeladas e analisadas quanto à actividade da α -galactosidase. O Quadro 8 mostra a actividade enzimática ao longo do tempo. A amostra de controlo, 0% de HES, exibiu essencialmente nenhuma actividade no Dia 3, enquanto que a amostra de 40% de HES exibiu cerca de 35% da sua actividade inicial no Dia 3 e cerca de 13% no Dia 12. Estes dados mostram que a β -galactosidase é estabilizada pela presença de HES.

Quadro 8: Efeito de HES na Promoção da Estabilidade da α -galactosidase

Estudo α Gal HES	Actividade (U/mL)		
	0% de HES	10% de HES	40% de HES
Tempo (Dia)			
0	307,2	310,7	374,2
4	0,3	0,7	130,6
6	0	0	90,9
10	0	0	54,7
12	0	0	46,9

Exemplo 4: Compostos Testados quanto à Aptidão para Promover a Actividade Enzimática

Cinco compostos foram avaliados quanto à sua aptidão para promover a actividade enzimática de três Enzimas Alvos (sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase): (1) glicerol, (2) propileno glicol, (3) um hidrolisado de proteína de soja, HY-SOY™ (Quest International, Chicago, IL), (4) hidroxietilamido ("HES"), (B. Braun, Puerto Rico, salvo indicação em contrário) e (5) Hmx1.

O HES foi preparado como uma solução-mãe a 20% (p/v) dissolvendo HES sólido em tampão a pH apropriado. Para este Exemplo foi utilizado tampão de citrato de sódio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM, pH 5,7. A solução-mãe a 20% (p/p) foi utilizada para preparar uma concentração final de 5% p/L sv de HES nas misturas de Enzima Alvo. As soluções-mães de Haemaccel (Hmx1) (Aventis-Behring Gmdh, Marburg, GE) a uma concentração de 3,5% foram utilizadas nas quantidades como indicadas nos Exemplos abaixo. O glicerol e o propilenoglicol foram adicionados a 10%

(p/v) e o HY-SOY™, um pó seco, a 5% (p/v) a tampão de citrato de cálcio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM, pH 5,7.

As misturas de Enzima Alvo contendo as três Enzimas Alvos foram preparadas combinando sialidase (210 U/L sv), β -galactosidase (33 U/L sv), β -hexosaminidase (2500 U/L sv), e Hmx1 (14 mL/L sv) ou HES (5% p/L sv). Cada mistura de Enzima Alvo foi então separadamente processada como se segue: A mistura foi transferida para uma coluna de Phenyl Sepharose™ (à temperatura ambiente) previamente equilibrada com tampão de citrato de sódio 100 mM contendo cloreto de cálcio 5 mM a pH 5,7, e em seguida subsequentemente carregada com substrato GCR a 70 até 120 U GCR/mL de resina da coluna. A actividade enzimática de GCR é medida utilizando ensaios padrão (ver, e. g., Patente U.S. 6451600). O substrato ligado à coluna. A mistura de Enzima Alvo foi então recirculada através da coluna à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. A mistura de Enzima Alvo foi então lavada da coluna, e o substrato foi eluído com propileno glicol e recolhido. Os resultados são mostrados no Quadro 9.

Quadro 9: Resultados de Compostos de Ensaio

Aditivo	% de Modificação (Ensaio FACE)
Sem aditivo	53,1
0,05% de Hmx1	69,1
10% de Glicerol	34,2
10% de Propilenoglicol	51,1
5% de HES	68,6
5% de HY-SOY™	57,2

A extensão da modificação de oligossacáridos/polissacáridos foi substancialmente aumentada na presença de Hmx1 ou hidroxietilamido (HES), como medida por electroforese de hidratos de carbono assistida com fluoróforo (FACE) (69,1 e 68,6, respectivamente; Quadro 9) em comparação com a ausência de aditivos (53,1 ; Quadro 9). Assim, o Hmx1 e o HES foram capazes de promover a actividade enzimática das Enzimas Alvos utilizadas nesta reacção. Os outros três compostos testados não exibiram promoção da Enzima Alvo (HY-SOY™ e propileno glicol) ou exibiram uma diminuição da promoção da Enzima Alvo (glicerol).

Exemplo 5: A Promoção da Actividade da Enzima Alvo por Hmx1 e HES

Foi utilizada a mesma quantidade das três Enzimas Alvos em cada uma das seis experiências mostradas abaixo no Quadro 10.

Uma mistura de sialidase (210 U/L sv), β -galactosidase (33 U/L sv) e β -hexosaminidase (2500 U/L sv) foi analisada sem qualquer polissacárido não natural ou na presença de Hmx1 (14 mL/L sv) ou HES (5% p/sv), à temperatura ambiente. A mistura de Enzima Alvo foi transferida para uma coluna Phenyl Sepharose™ previamente equilibrada com tampão de citrato de sódio 100 mM contendo cloreto de cálcio 5 mM a pH 5,7 e, em seguida, subsequentemente carregada com substrato a 70 até 120 U GCR/mL de resina da coluna. O substrato ligado à coluna. A mistura de Enzima Alvo foi então recirculada através da coluna à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas. Após aproximadamente 24 horas, a mistura de Enzima Alvo foi lavada da

coluna e o substrato foi eluído e recolhido e avaliado através de análise por FACE. Os resultados são mostrados no Quadro 10.

Quadro 10: A Promoção da Actividade da Enzima Alvo na Presença de Hxml ou HES

Exp. N°	Sialidase U/L sv	β -gal U/L sv	β -hex U/L sv	pH	HES % p/L sv	Hxml mL/L sv	FACE
1	210	33	2500	5,7	0	0	54,4
2	210	33	2500	5,7	0	14	70,4
3	210	33	2500	5,7	0	14	75,1
4	210	33	2500	5,7	5	0	84,5
5	210	33	2500	5,7	5	0	80,6

Os dados do Quadro 10 demonstram que os Hxml e HES podem promover a actividade enzimática da Enzima Alvo, *i. e.*, melhoram a aptidão das Enzimas Alvos para produzir modificações em oligossacáridos/polissacáridos. A modificação de oligossacáridos/polissacáridos é substancialmente reduzida na ausência de Hxml ou HES (ver Quadro 10, Exp. N° 1). Embora os HES e Hxml sejam promotores eficazes da actividade da Enzima Alvo, o Hxml é um péptido de origem animal, enquanto que o HES é um polissacárido derivado de fontes não animais (*e. g.*, vegetais). Por conseguinte, os polissacáridos desta divulgação são particularmente úteis para promover a actividade de uma Enzima Alvo em situações em que não são desejáveis componentes animais, tal como na produção ou fabrico de agentes terapêuticos humanos ou veterinários, alimentos ou produtos de consumo.

Exemplo 6: A Promoção da Actividade da Enzima Alvo pelo HES Reduz a Quantidade de Enzimas Alvos Necessária para Conseguir uma Modificação de Substrato Comparável

Neste Exemplo, a mistura de Enzima Alvo utilizada para modificação de oligossacáridos/polissacáridos continha 5% p/L sv de HES ou não continha HES.

Para as misturas de Enzima Alvo contendo HES foram adicionadas sialidase (105 U/L sv), β -galactosidase (β -gal, 16,5 U/L sv) e β -hexosaminidase (β -hex, 1250 U/L sv) em citrato de sódio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM, pH 5,5 ao HES (quantidade final de HES de 5% p/L sv).

Para as misturas de Enzima Alvo, preparadas na ausência de um polissacárido não natural, as sialidase (168 U/L sv), β -galactosidase (52,8 U/L sv) e β -hexosaminidase (3000 U/L sv) foram combinadas em citrato de sódio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM, pH 5,5.

Todas as misturas foram mantidas a 2-10 °C até à sua utilização. Cada mistura de Enzima Alvo foi então separadamente processada como se segue:

A mistura de Enzima Alvo foi adicionada a uma coluna Phenyl Sepharose™ que tinha sido equilibrada com tampão de citrato de sódio 100 mM, contendo cloreto de cálcio 5 mM a pH 5,5 e em seguida carregada com substrato (70 a 120 U GCR/mL de resina), à temperatura ambiente. A mistura de Enzima Alvo foi recirculada através da coluna durante aproximadamente 24 horas. A coluna foi então lavada com um volume da coluna de equilíbrio e, em seguida, com cinco volumes da coluna de tampão contendo 20% de

propileno glicol, para remover a mistura de Enzimas Alvos. O substrato foi eluído da coluna com propileno glicol. Os componentes oligossacarídicos resultantes de cada uma das sete reacções de ensaio foram avaliados através do ensaio FACE e são mostrados no Quadro 11.

Quadro 11: Promoção da Actividade da Enzima Alvo num Substrato GCR na Presença de HES a pH 5,5

Exp. N°	Sialidase U/sv	β -gal U/sv	β -hex U/sv	HES (%/sv)	FACE
1	168	52,8	300	0	69,4
2	168	52,8	3000	0	69,9
3	168	52,8	3000	0	70,0
4	168	52,8	3000	0	71,8
5	105	16,5	1250	5	72
6	105	16,5	1250	5	72,7
7	105	16,5	1250	5	72,7

As três experiências na presença de 5% de HES (Exp. N° 5-7), precisaram de quantidades substancialmente inferiores das três Enzimas Alvos para conseguir a modificação de oligossacáridos/polissacáridos, em comparação com as experiências realizadas na ausência de HES (Exp. N° 1-4). O valor FACE médio para as quatro reacções de ensaio na ausência de HES foi 70,3 +/- 1,1, enquanto que o valor FACE médio para as experiências na presença de HES foi 72,5 +/- 0,4. É importante dizer que as misturas de Enzima Alvo sem aditivo continham 1,6x (em que 'x' é o múltiplo de) a quantidade de sialidase, 3,2x a quantidade de β -galactosidase e 2,4x a quantidade de β -hexosaminidase em comparação com as misturas de Enzima Alvo

contendo HES. Assim, na ausência de HES, o processo requer quantidades consideravelmente maiores de Enzimas Alvos.

Noutro estudo (ver Quadro 12), a mistura de Enzima Alvo foi utilizada com uma reacção de modificação de oligossacáridos/polissacáridos que continha 5% p/L sv de HES ou não continha HES.

Uma solução-mãe de 20% (p/p) de HES, produzida dissolvendo HES sólido em citrato de sódio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM, pH 5,5, foi utilizada para preparar uma concentração final de 5% p/L sv de HES numa mistura contendo as unidades de enzima mostradas no Quadro 12, em citrato de sódio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM, pH 5,5.

Para as misturas de Enzima Alvo, preparadas na ausência de um polissacárido não natural, as misturas foram preparadas de modo a conter as unidades de enzima (U/L sv) mostradas no Quadro 12.

As misturas foram mantidas a 2-10 °C até à sua utilização. Cada mistura de Enzima Alvo foi então separadamente processada como se segue:

A mistura de Enzima Alvo foi adicionada a uma coluna Phenyl Sepharose™ que tinha sido equilibrada com tampão de citrato de sódio 100 mM, contendo cloreto de cálcio 5 mM a pH 5,5 e em seguida carregada com substrato (70 a 120 U GCR/mL resina), à temperatura ambiente. A mistura de Enzima Alvo foi recirculada através da coluna durante aproximadamente 24 horas. Após a modificação do oligossacárido, a coluna foi lavada para remover a mistura de Enzima Alvo. O substrato foi eluído da coluna

utilizando propileno glicol. O componente oligossacarídico resultante de cada uma das cinco reacções de ensaio foi avaliado através do ensaio FACE. Os resultados são mostrados no Quadro 12.

Quadro 12: Quantidades Menores de Enzimas Alvos Necessárias nas Reacções Contendo HES

Exp. N°	Sialidase U/sv	β -gal U/sv	β -hex U/sv	HES (%/sv)	FACE
1	168	52,8	3000	0	69,4
2	105	16,5	1250	5	72,0
3	168	52,8	3750	0	77,1
4	84	19,8	1500	5	76,9
5	210	33	2500	5	85,0

Os dados no Quadro 12 demonstram que foram obtidos valores FACE comparáveis (ou mais altos) com quantidades menores de Enzimas Alvos nas reacções contendo HES. *e. g.*, comparar: Exp. N° 1 contra Exp. N° 2; comparar também *e. g.*, Exp. N° 3 contra Exp. N° 4. Além disso, para conseguir um FACE mais elevado de 85 na presença de HES (Exp. N° 5), o qual é um valor FACE que é 7,9% superior ao da Exp. N° 3 (realizada na ausência de um promotor da Enzima Alvo) foi necessário menos 38% de β -galactosidase, menos 33% de β -hexosaminidase e apenas um aumento modesto da sialidase para 25% na Exp. N° 5 contendo HES.

Exemplo 7: HES é Compatível Com uma Variedade de Concentrações de Enzima Alvo.

As condições utilizadas neste exemplo foram como descritas no Exemplo 6, excepto que todas as experiências incluíram HES a 5% p/L sv.

Quadro 13: O Nível Crescente de Enzima Alvo Aumenta a Modificação do Substrato de Oligossacárido/Polissacárido (GCR)

Exp. N°	Sialidase U/sv	β -gal U/sv	β -hex U/sv	FACE
1	84	13,2	1000	67,4
2	84	13,2	1500	72,8
3	105	16,5	1500	74,1
4	84	19,8	1500	76,9
5	210	33	2500	85,0

Os dados no Quadro 13 demonstram que o aumento da quantidade de Enzimas Alvos em HES, aumenta a modificação de oligossacáridos/polissacáridos. O valor FACE aumentou em 17,6%, desde 67,4 (Exp. N° 1) para 85,0 (Exp. N° 5) através de um aumento de 2,5x da sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase. Assim, o HES é compatível com uma variedade de concentrações de enzima.

Exemplo 8: O efeito do pH na Promoção da Enzima Alvo

As condições utilizadas neste Exemplo foram como descritas no Exemplo 7, excepto que o pH (da mistura de Enzima Alvo,

tampão de equilíbrio e lavagens da coluna) foi o pH designado no Quadro 14 e a presença de HES foi como indicada no Quadro 14.

Quadro 14: Efeito do pH na Promoção da Enzima Alvo

Exp. N°	Sialidase U/sv	β -gal U/sv	β -hex U/sv	pH	HES (p/sv)	FACE
1	126	19,8	1500	5,5	5	75,3
2	210	39,6	1500	5,7	5	75,8
3	210	66	3750	5,7	0	76,0
4	252	79,2	4500	5,9	0	72,2

O pH de uma reacção de modificação enzimática pode ter um efeito no perfil de oligossacáridos de um substrato. Na ausência de HES, mesmo quando são utilizadas maiores quantidades de Enzimas Alvos, não foi obtido um FACE comparável quando o pH foi aumentado desde 5,7 para 5,9 (ver Exp. N° 3 e Exp. N° 4; Quadro 14). Na presença de HES, o aumento do pH desde 5,5 para 5,7 precisou apenas de aumentos modestos nos níveis de Enzima Alvo para conseguir valores FACE comparáveis a ambos os pH, (comparar Exp. N°2 contra Exp. N°1). Além disso, a inclusão de HES na mistura de Enzima Alvo, reduziu a quantidade de Enzima Alvo necessária para conseguir um FACE comparável a um dado pH (e. g., comparar Exp. N°2 e Exp. N°3). Isto indica que um polissacárido não natural tal como o HES permite que seja utilizada uma quantidade menor de Enzimas Alvos ao longo de uma gama de pH e, por conseguinte, alarga a gama de pH à qual uma Enzima Alvo pode ser utilizada para obter a sua actividade desejada.

Exemplo 9: O Aumento da Concentração de HES Melhora a Promoção da Enzima Alvo

As condições utilizadas neste Exemplo foram como descritas no Exemplo 8, excepto que o pH da mistura de Enzima Alvo, tampão de equilíbrio e lavagens da coluna foi a pH 5,5, a mistura de Enzima Alvo continha 2% ou 5% p/L sv de HES e as quantidades de Enzima Alvo foram idênticas umas às outras em ambas as experiências.

Quadro 15: Efeitos das Concentrações de HES

Exp. N°	Sialidase U/sv	β -gal U/sv	β -hex U/sv	HES (%/sv)	FACE
1	210	33	2500	2	77,3
2	210	33	2500	5	85,0

Os dados no Quadro 15 indicam que o aumento da concentração de HES desde 2% para 5% melhora a promoção da Enzima Alvo. Neste Exemplo, os valores FACE aumentaram 7,7%, quando o HES aumentou desde 2% para 5%.

Além disso, os dados indicam que o HES promove a actividade da Enzima Alvo a uma concentração de 2%. Na ausência de HES, a pH 5,5, foram necessárias quantidades de Enzima Alvo de 79,2 U/L sv de β -galactosidase (2,4x a quantidade na Exp. N°1 do Quadro 15) e 3000 U/L sv de β -hexosaminidase (1,2x a quantidade na Exp. N°1 do Quadro 15) para valores FACE comparáveis (76,9, Exp. N°1 77,3; utilizando as mesmas condições como utilizadas no Quadro 15, excepto no que se refere à concentração da Enzima Alvo).

Exemplo 10. HES de Diferentes Fontes Comercialmente Disponíveis e Diferentes PMM e MS, Promovem a Actividade da Enzima Alvo

O HES de duas fontes comercialmente disponíveis adicionais, Ajinomoto (Raleigh, North Carolina, EUA) e Fresenius Kabi (Linz, Áustria), foram comparados com o HES de B. Braun quanto à promoção da actividade da Enzima Alvo numa reacção de modificação de oligossacáridos/polissacáridos.

As condições utilizadas neste Exemplo foram como descritas no Exemplo 10, excepto que o pH da mistura de Enzima Alvo, tampão de equilíbrio e lavagens da coluna foi a pH 5,7, e a mistura de Enzima Alvo continha HES a 5% p/L sv de B. Braun, Ajinomoto ou Fresenius Kabi. As quantidades de Enzima Alvo foram idênticas para cada experiência no Quadro 16 (210 U/L sv de sialidase, 39,6 U/L sv de β -galactosidase e 1500 U/L sv de β -hexosaminidase).

Três lotes diferentes de HES de Ajinomoto e três lotes diferentes de HES de Fresenius Kabi foram comparados com o HES de B Braun. O HES de Ajinomoto está comercialmente disponível num peso molecular médio (PMM) numa gama de 550-760 kDa e numa substituição molar (MS) de 0,70-0,80 molar. O HES de Fresenius Kabi está comercialmente disponível num peso molecular médio na gama de 400-500 kDa e numa substituição molar de 0,65-0,75. Os PMM e MS indicados pelos fabricantes para os lotes de HES utilizados no estudo são mostrados no Quadro 16.

Quadro 16. Promoção da Actividade da Enzima Alvo utilizando HES de Três Vendedores Diferentes

Fabricante	Lote	Repetições (n)	PMM (kd)/(MS) do Fabricante	FACE
B. Braun	1	1	546/(0,76)	73,7
Ajinomoto	1	3	654/(0,8)	74,0 +/- 2,8
Ajinomoto	2	1	684/(0,76)	70,1
Ajinomoto	3	1	701/(0,76)	75,4
Média		5	na	73,5 +/- 2,8
Fresenius Kabi	1	2	448/(0,72)	72,7 +/- 6,9
Fresenius Kabi	2	1	455/(0,71)	77,3
Fresenius Kabi	3	1	424/(0,69)	74,4
Média		4	na	74,3 +/- 4,5

na= não aplicável

Os dados no Quadro 16 indicam que foi encontrada uma promoção comparável da actividade da Enzima Alvo utilizando HES adquirido de B. Braun, Ajinomoto e Fresenius Kabi. Assim, foi determinado que ligeiras variações nos PMM e MS do HES, entre lotes de HES do mesmo vendedor e de vendedores diferentes, não afectam significativamente a promoção, pelo HES, da actividade das Enzimas Alvos para o seu substrato.

Exemplo 11 : A Promoção da Actividade da Enzima Alvo pelo HES é Independente do Volume do Sistema (sv)

As condições utilizadas neste Exemplo foram como descritas no Exemplo 10, excepto que foi utilizado apenas HES da B. Braun

nas experiências. As quantidades de Enzima Alvo foram idênticas para cada experiência no Quadro 17, nomeadamente: 210 U/L sv de sialidase, 39,6 U/L sv de β -galactosidase e 1500 U/L sv de β -hexosaminidase. A "Escala" indicada reflecte uma comparação entre o volume dos sistemas utilizados em cada experiência mostrada no Quadro 17 (incluindo o volume ocupado pela resina de fenilo e tubagem). Por exemplo, um volume do sistema de 1500X significa que o volume do sistema é 1500 vezes maior do que um volume do sistema de 1X (sv).

Quadro 17: Promoção da Actividade da Enzima Alvo pelo HES em Diferentes Volumes do Sistema

Escala (sv)	Repetições (n)	FACE
1x	3	77,7 +/- 2,7
1500x	3	76,7 +/- 1,9

Os dados no Quadro 17 indicam que a promoção da actividade da Enzima Alvo pelo HES é independente da escala do volume do sistema. Neste Exemplo, a promoção da actividade da Enzima Alvo pelo HES é eficaz e comparável numa grande gama de volumes do sistema. Assim, a invenção é aplicável a uma variedade de processos enzimáticos à escala industrial e comercial.

Exemplo 12: Efeito do HES na Estabilidade da α -galactosidase em Tampão

É realizado um estudo prognóstico para avaliar o efeito do HES na estabilidade da α -galactosidase. A α -galactosidase a cerca de 5,0 mg/mL em Fosfato de Sódio 50 mM, pH 7,0 contendo

0%, 10% ou 40% de hidroxiletilamido é filtrada assepticamente para um recipiente apropriado e mantida a 25 °C durante até 12 meses. São recolhidas amostras estéreis aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses e congeladas a -80 °C. As amostras são descongeladas para análise e avaliadas por um ensaio de actividade de α -galactosidase. O Quadro 18 mostra a actividade em pontos no tempo como uma percentagem da actividade inicial (T0).

Quadro 18: Efeito do HES na Promoção da Estabilidade da α -galactosidase em Tampão

Estudo α -galactosidase HES	Actividade (% T0)				
	T0	3 meses	6 meses	8 meses	12 meses
Concentração de HES					
0% (controlo)	100	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0
10%	100	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo
40%	100	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo

As amostras de α -galactosidase contendo 10% e 40% de HES retiveram no mínimo 50% ou mais actividade do que as amostras de α -galactosidase que não continham HES. Por conseguinte, a α -galactosidase é estabilizada pela presença de HES.

Exemplo 13: Efeito do HES na Estabilidade da α -galactosidase em Tampão e Manitol

É realizado um estudo prognóstico para avaliar o efeito do HES na estabilidade da α -galactosidase. A α -galactosidase a 5,0 mg/mL em Fosfato de Sódio 50 mM, 3% de manitol (p/p), pH 7,0, contendo 0%, 10% ou 40% de HES é filtrada assepticamente para um recipiente apropriado e mantida a 25 °C durante até 12 meses. São recolhidas amostras estéreis aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses e congeladas a -80 °C. As amostras são descongeladas para análise e avaliadas por um ensaio de actividade de α -galactosidase. O Quadro 19 mostra a actividade em pontos no tempo como uma percentagem da actividade inicial (T0).

Quadro 19: α -galactosidase HES, Dados de Estudo de Actividade

Estudo α -galactosidase HES	Actividade (% T0)				
	T0	3 meses	6 meses	8 meses	12 meses
Concentração de HES					
0% (controlo)	100	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0
10%	100	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo
40%	100	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo

As amostras de α -galactosidase contendo 10% e 40% de hidroxiletilamido retiveram no mínimo 50% ou mais actividade do que as amostras de α -galactosidase que não continham HES. Por conseguinte, a α -galactosidase é estabilizada pela presença de HES.

Exemplo 14: Efeito do HES na Estabilidade da α -galactosidase Após Reconstituição do Produto Liofilizado com Água Contendo HES

É realizado um estudo prognóstico para avaliar a estabilidade da α -galactosidase liofilizada após reconstituição em água contendo 0%, 10% ou 40% de HES, e na presença ou ausência de um conservante adequado tal como álcool benzílico ou fenol. A α -galactosidase a 5,0 mg/mL em Fosfato de Sódio 50 mM, 3% de manitol, pH 7,0 é liofilizada em recipientes apropriados (frascos). Os frascos reconstituídos são mantidos a 25 °C e é recolhida uma amostra aos 0, 5, 10, 20 e 30 dias e avaliada por um ensaio de pNP. O Quadro 20 mostra a actividade em pontos no tempo como uma percentagem da actividade inicial (T0).

Quadro 20: Efeito do HES na Estabilidade da α -galactosidase após Reconstituição do Produto Liofilizado com Água Contendo HES

Estudo α -galactosidase HES	Actividade (% T0)				
	Concentração de HES	T0	5 dias	10 dias	20 dias
0% (controlo)	100	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0	menos do que 50% da actividade a T0
10%	100	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo
40%	100	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo	aumento de 50% ou mais em relação ao controlo

As amostras de α -galactosidase contendo 10% e 40% de HES retiveram no mínimo 50% ou mais actividade do que as amostras de α -galactosidase que não continham HES. Por conseguinte, a α -galactosidase é estabilizada pela presença de HES.

Por conseguinte, os Exemplos aqui demonstram uma grande gama de utilidades para as composições e métodos da divulgação, incluindo os métodos da invenção.

A citação de quaisquer referências aqui não é um reconhecimento que essas referências são técnica anterior à presente invenção. Todas as concentrações de polissacáridos são expressidas como volume por peso, salvo indicação em contrário.

Lisboa, 29 de Junho de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Método de promoção da actividade enzimática de uma Enzima Alvo, compreendendo o método:

(i) combinar uma Enzima Alvo, em que a Enzima Alvo é:

(a) uma enzima de oligossacárido/polissacárido seleccionada do grupo consistindo de: Galactosiltransferase, GalNAc-transferase, Oligossacariltransferase, N-acetilglucosaminilfosfotransferase, glicosiltransferase ligada por O, glicosiltransferase ligada por N, α -Manosidase, β -Galactosidase, Sialidase (neuraminidase), β -N-acetil-hexosaminidase, N-Acetil-glucosamina-1-fosfodiéster α -N-acetilglucosaminidase, N-Glicanase (N-glicosidase F), O-Glicanase (endo- α -N-acetilgalactosaminidase), Endo- β -N-acetilglucosaminidase H, Sialato-O-acetiltransferase, Sialato-O-acetilesterase e Alfa-glucosidase, ou

(b) uma hidrolase lisossómica seleccionada do grupo consistindo de: α -Galactosidase A, Ceramidase ácida, α -L-Fucosidase ácida, β -Glucocerebrosidase ácida (GCR), β -galactosidase ácida, Iduronato-2-sulfatase, α -L-Iduronidase, Galactocerebrosidase, α -Manosidase ácida, β -Manosidase ácida, Arilsulfatase B, Arilsulfatase A, N-Acetilgalactosamina-6-sulfato-sulfatase,

β -Galactosidase ácida, Esfingomielinase ácida,
 α -Glucosidase ácida, β -Hexosaminidase B, Heparano
N-sulfatase, α -*N*-Acetilglucosaminidase,
Acetil-CoA: α -glucosaminida *N*-acetiltransferase,
N-Acetilglucosamina-6-sulfato-sulfatase,
 α -*N*-acetilgalactosaminidase, Sialidase,
 β -Glucuronidase e β -Hexosaminidase A;

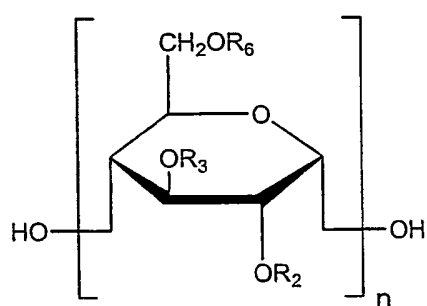
com cerca de 1% a cerca de 50% p/v de um hidroxialquilamido e com um substrato da Enzima Alvo, produzindo desse modo uma combinação; e

(ii) manter a combinação sob condições suficientes para promover a actividade enzimática da Enzima Alvo, em que as condições são entre cerca de 1 °C e cerca de 40 °C.

2. Método da Reivindicação 1, em que o hidroxialquilamido é seleccionado do grupo consistindo de hidroximetilamido, hidroxietilamido (HES), hidroxipropilamido e hidroxibutilamido.
3. Método da Reivindicação 2, em que o hidroxialquilamido é hidroxietilamido (HES).
4. Método de qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, em que o substrato é uma hidrolase lisossómica.
5. Método da Reivindicação 1, em que a Enzima Alvo é seleccionada do grupo consistindo de: sialidase, β -galactosidase, β -*N*-acetil-hexosaminidase e uma combinação das mesmas; em que o amido não natural é HES; e em que o substrato é β -glucocerebrosidase.

6. Método de qualquer uma das Reivindicações 1 a 5, em que o método compreende ainda permitir que a Enzima Alvo modifique o substrato de modo a produzir um substrato modificado e recuperar o substrato modificado.
7. Método da Reivindicação 1, em que a Enzima Alvo é uma combinação de sialidase, β -galactosidase e β -hexosaminidase; e em que o amido não natural é HES, o qual está presente numa quantidade entre cerca de 1% e cerca de 12% p/v.
8. Método da Reivindicação 1, em que as condições compreendem ainda um tampão de citrato e cloreto de cálcio a um pH de cerca de 6.

Lisboa, 29 de Junho de 2012

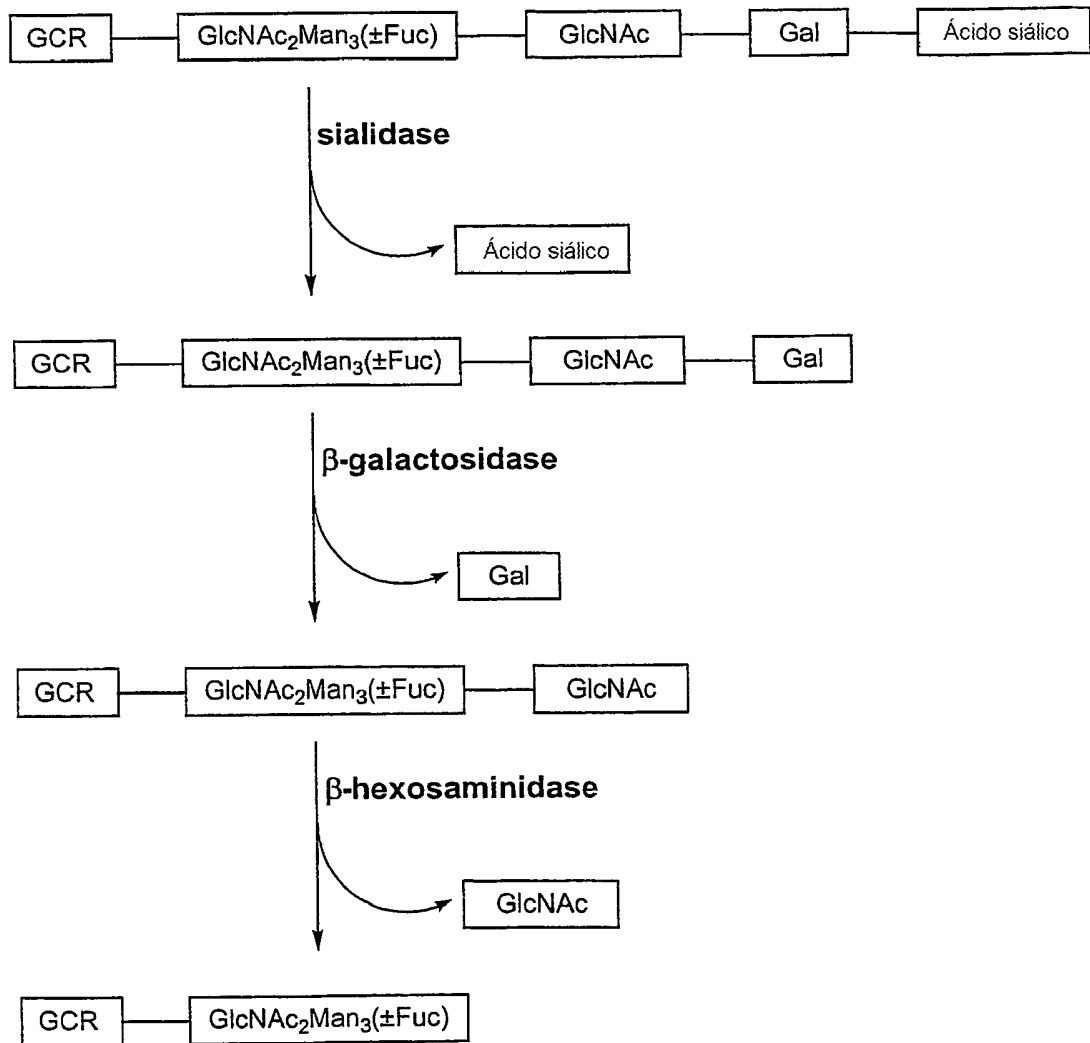


$R_2 = \text{H}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

$R_3 = \text{H}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

$R_6 = \text{H}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ou ligação 1,6 a outras unidades de α -D-glucopiranosilo

Fig. 1

**Fig. 2**

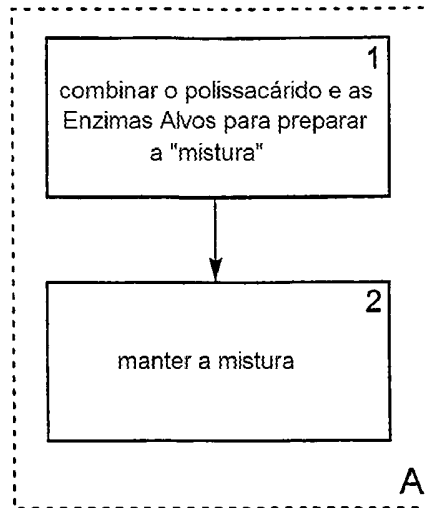


Fig. 3

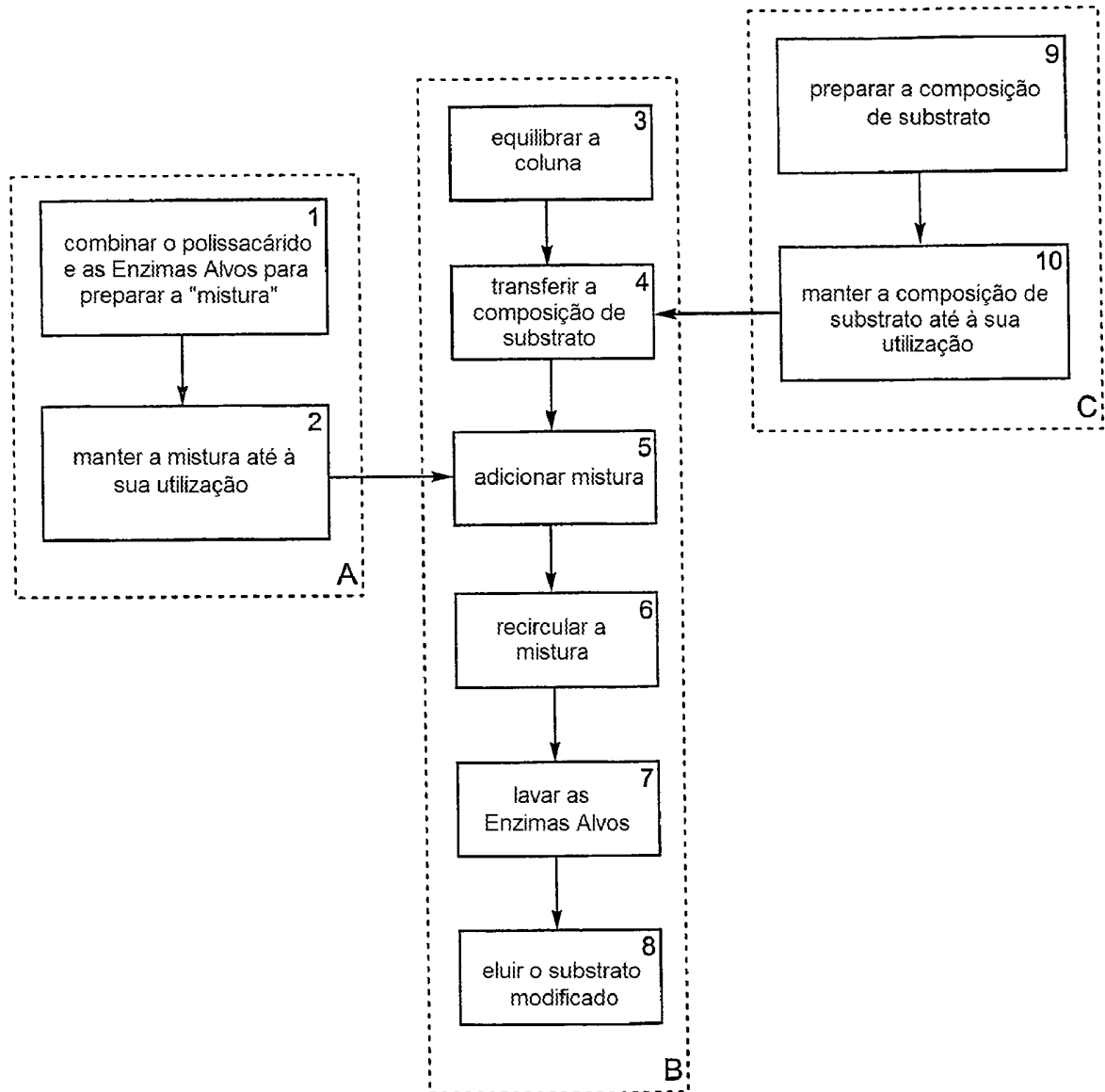


Fig. 4

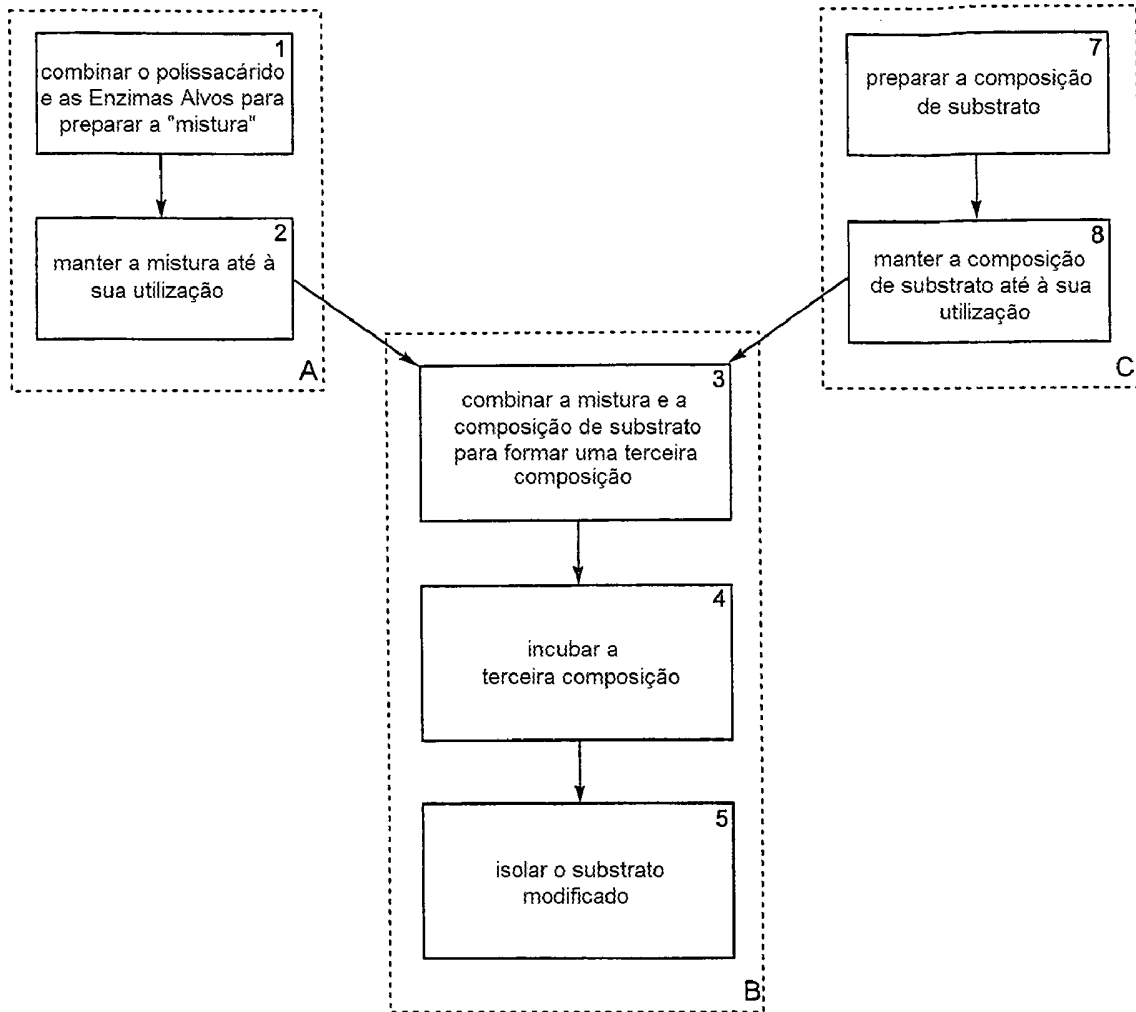


Fig. 5

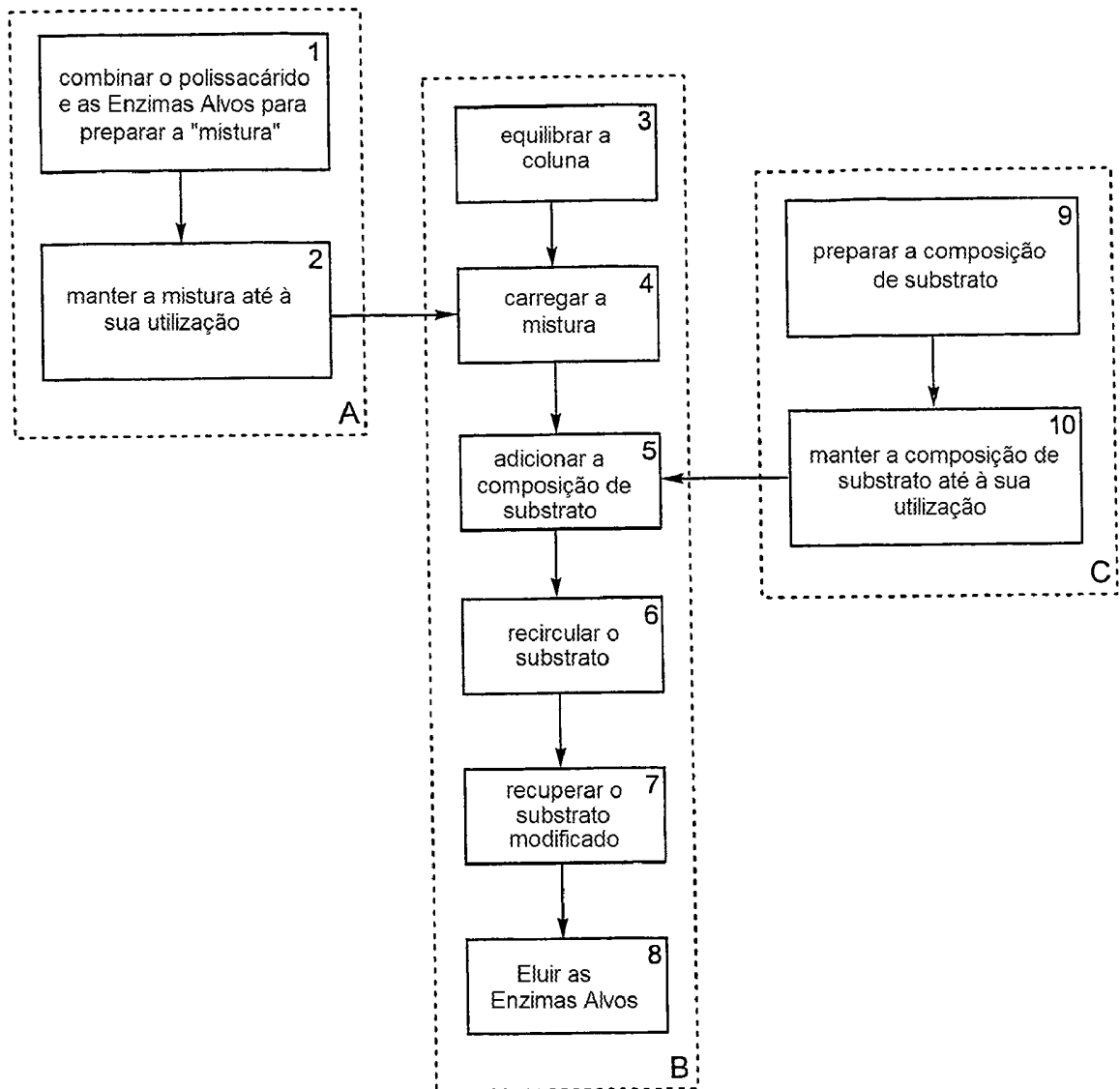


Fig. 6

Efeito de HES na Promoção da Actividade da rGCR

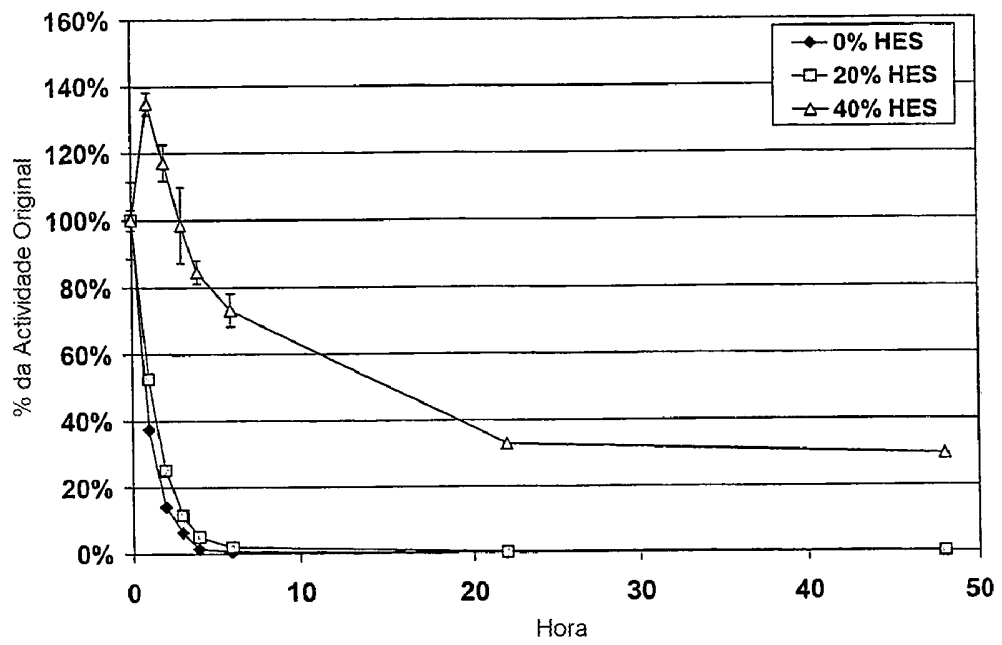


Fig. 7

Efeito de HES na Promoção da Actividade da α -Glucosidade

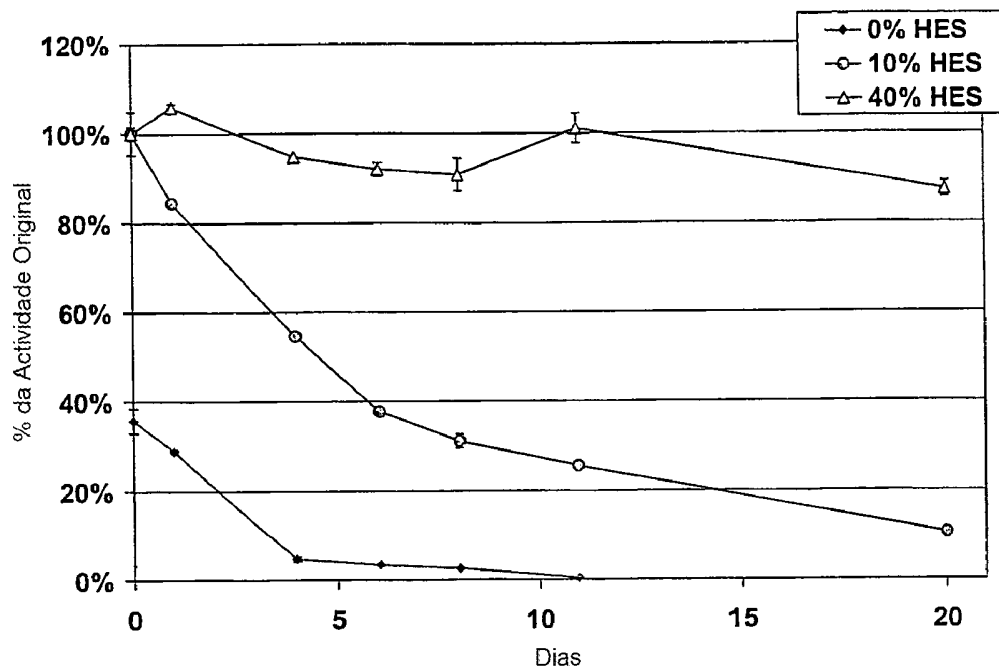


Fig. 8

Efeito de HES na Promoção da Actividade da α -Galactosidase

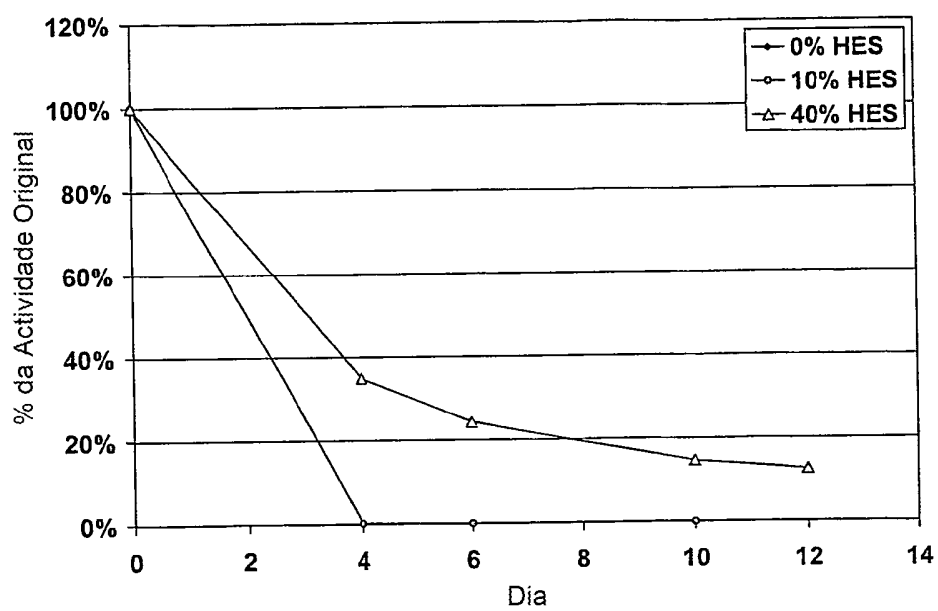


Fig. 9