



(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 38816 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 38/00; C12N 9/96; C12N 9/14**
- (43) Date de publication : **31.10.2018**

-
- (21) N° Dépôt : **38816**
- (22) Date de Dépôt : **01.04.2015**
- (30) Données de Priorité : **01.04.2014 EP 14162996**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/EP2015/057256 01.04.2015**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation:EP15713502.1
- (71) Demandeur(s) : **Swedish Orphan Biovitrum AB (Publ), 112 76 Stockholm (SE)**
- (72) Inventeur(s) : **BERGHARD, Charlotta ; NORDLING, Erik ; SVENSSON GELIUS, Stefan ; TJERNBERG, Agneta**
- (74) Mandataire : **H & H CONSULTING LAW FIRM**
-
- (54) Titre : **SULFAMIDASE MODIFIÉE ET SA PRODUCTION**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne une sulfamidase modifiée, une composition comprenant une sulfamidase modifiée, ainsi que des procédés de préparation d'une sulfamidase modifiée et l'utilisation thérapeutique d'une telle sulfamidase. En particulier, la présente invention concerne une sulfamidase modifiée ne comprenant pratiquement pas d'épitopes pour des récepteurs de reconnaissance de glycane, permettant ainsi le transport de ladite sulfamidase à travers la barrière hémato-encéphalique d'un mammifère, ladite sulfamidase ayant une activité catalytique dans le cerveau dudit mammifère.

Revendications

1. Sulfamidase modifiée ne comprenant sensiblement pas d'épitopes pour des récepteurs de reconnaissance de glycane, dans laquelle les fragments de glycane naturels de ladite sulfamidase sont rompus par des ruptures de simple liaison et des ruptures de double liaison, le degré de rupture de simples liaisons par rapport aux ruptures de liaison totales étant d'au moins 60 % dans les glycanes d'oligomannose, de façon à permettre le transport de ladite sulfamidase à travers la barrière hémato-encéphalique d'un mammifère, ladite sulfamidase ayant une activité catalytique dans le cerveau dudit mammifère.
2. Sulfamidase modifiée selon la revendication 1, ayant une teneur relative de fragments de glycane naturels intacts résiduels d'environ 25 % de la teneur de fragments de glycane naturels dans une sulfamidase recombinante non modifiée.
3. Sulfamidase modifiée selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant un polypeptide constitué d'une séquence d'acides aminés telle que définie dans SEQ ID NO: 1, ou un polypeptide ayant au moins 95 % d'identité de séquence avec une séquence d'acides aminés telle que définie dans SEQ ID NO: 1, dans laquelle lesdits épitopes sont absents à au moins quatre des cinq sites de N-glycosylation : N à la position 21 (N(21)), N à la position 122 (N(122)), N à la position

- 2 -

131 (N(131)), N à la position 244 (N(244)), et N à la position 393 (N(393)) de SEQ ID NO: 1.

4. Sulfamidase modifiée selon la revendication 3, comprenant un glycane d'oligomannose au site N(131), ledit oligomannose étant rompu par des ruptures de simple liaison et des ruptures de double liaison, la rupture étant caractérisée par un degré de ruptures de simple liaison d'au moins 60 %.

5. Sulfamidase modifiée selon l'une quelconque des revendications 3 à 4, comprenant un résidu C α -formylglycine à la position 50 de SEQ ID NO: 1 (FGly50) produisant ladite activité catalytique.

6. Composition de sulfamidase comprenant une sulfamidase modifiée n'ayant sensiblement pas d'épitopes pour des récepteurs de reconnaissance de glycane, dans laquelle les fragments de glycane naturels de ladite sulfamidase sont rompus par des ruptures de simple liaison et des ruptures de double liaison, le degré de rupture de simples liaisons par rapport aux ruptures de liaison totales étant d'au moins 60 % dans les glycanes d'oligomannose, de façon à permettre le transport de ladite sulfamidase à travers la barrière hémato-encéphalique d'un mammifère, et ayant un rapport de la C α -formylglycine (FGly) à la sérine (Ser) au site actif qui est supérieur à 1, de façon à produire une activité catalytique dans le cerveau dudit mammifère.

7. Procédé de préparation d'une sulfamidase modifiée, ledit procédé comprenant :

a) la réaction d'une sulfamidase glycosylée avec un periodate de métal alcalin pendant une durée de pas plus de 4 h, et

b) la réaction de ladite sulfamidase avec un borohydrure de métal alcalin pendant une durée de pas plus de 2 h ;

- 3 -

de façon à modifier des fragments de glycane de la sulfamidase et réduire l'activité de la sulfamidase vis-à-vis des récepteurs de reconnaissance de glycane, tout en conservant l'activité catalytique de ladite sulfamidase, dans lequel ladite sulfamidase modifiée présente une activité catalytique dans le cerveau d'un mammifère.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel ledit borohydrure est utilisé à une concentration comprise entre 10 et 80 mM.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, dans lequel l'étape a) est conduite pendant une durée de pas plus de 3 h, telle que pas plus de 2 h, telle que pas plus de 1 h, telle qu'environ 0,5 h.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans lequel l'étape a) et l'étape b) sont conduites en séquence sans conduire une étape intermédiaire.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, dans lequel l'étape a) est en outre caractérisé par au moins l'un de, par exemple au moins deux, par exemple la totalité de i) à iii) :

- i) ledit periodate de métal alcalin est le métaperiodate de sodium ;
- ii) ledit periodate est utilisé à une concentration de pas plus de 20 mM, telle que pas plus de 15 mM, telle qu'environ 10 mM, et
- iii) ladite réaction est conduite à une température comprise entre 0 et 22 °C, telle qu'une température de 0 à 8 °C, telle qu'une température de 0 à 4 °C, telle qu'environ 8 °C, telle qu'environ 0 °C.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, dans lequel l'étape b) est en

- 4 -

autre caractérisé par au moins l'un de, par exemple au moins deux, par exemple la totalité de i) à iv) :

i) ledit borohydrure de métal alcalin étant le borohydrure de sodium ;

5 ii) ledit borohydrure est utilisé à une concentration de pas plus de 4 fois la concentration dudit periodate, telle que pas plus de 3 fois la concentration dudit periodate, telle que pas plus de 2,5 fois la concentration dudit periodate, telle que 0,5 à 4 fois la concentration dudit periodate ;

10 iii) ladite réaction est conduite pendant une durée de pas plus de 1,5 h, telle que pas plus de 1 h, telle que pas plus de 0,75 h, telle qu'environ 0,5 h, et

15 iv) ladite réaction est conduite à une température comprise entre 0 et 8 °C.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, comprenant en outre

20 a2) l'inactivation de la réaction résultant de l'étape a), et/ou b2) l'inactivation de la réaction résultant de l'étape b).

14. Sulfamidase modifiée pouvant être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 13.

25

15. Sulfamidase modifiée ou composition de sulfamidase selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 14, pour utilisation en thérapie.

30 16. Sulfamidase modifiée ou composition de sulfamidase selon la revendication 15, pour utilisation dans le traitement d'un mammifère atteint d'une maladie du stockage lysosomal, en particulier la mucopolysaccharidose IIIA (MPS IIIA).

Revendications

1. Sulfamidase modifiée ne comprenant sensiblement pas d'épitopes pour des récepteurs de reconnaissance de glycane, dans laquelle les fragments de glycane naturels de ladite sulfamidase sont rompus par des ruptures de simple liaison et des ruptures de double liaison, le degré de rupture de simples liaisons par rapport aux ruptures de liaison totales étant d'au moins 60 % dans les glycanes d'oligomannose, de façon à permettre le transport de ladite sulfamidase à travers la barrière hémato-encéphalique d'un mammifère, ladite sulfamidase ayant une activité catalytique dans le cerveau dudit mammifère.
- 15
2. Sulfamidase modifiée selon la revendication 1, ayant une teneur relative de fragments de glycane naturels intacts résiduels d'environ 25 % de la teneur de fragments de glycane naturels dans une sulfamidase recombinante non modifiée.
- 20
3. Sulfamidase modifiée selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant un polypeptide constitué d'une séquence d'acides aminés telle que définie dans SEQ ID NO: 1, ou un polypeptide ayant au moins 95 % d'identité de séquence avec une séquence d'acides aminés telle que définie dans SEQ ID NO: 1, dans laquelle lesdits épitopes sont absents à au moins quatre des cinq sites de N-glycosylation : N à la position 21 (N(21)), N à la position 122 (N(122)), N à la position
- 25
- 30

131 (N(131)), N à la position 244 (N(244)), et N à la position 393 (N(393)) de SEQ ID NO: 1.

4. Sulfamidase modifiée selon la revendication 3, comprenant un glycane d'oligomannose au site N(131), ledit oligomannose étant rompu par des ruptures de simple liaison et des ruptures de double liaison, la rupture étant caractérisée par un degré de ruptures de simple liaison d'au moins 60 %.

10

5. Sulfamidase modifiée selon l'une quelconque des revendications 3 à 4, comprenant un résidu C α -formylglycine à la position 50 de SEQ ID NO: 1 (FGly50) produisant ladite activité catalytique.

15

6. Composition de sulfamidase comprenant une sulfamidase modifiée n'ayant sensiblement pas d'épitopes pour des récepteurs de reconnaissance de glycane, dans laquelle les fragments de glycane naturels de ladite sulfamidase sont rompus par des ruptures de simple liaison et des ruptures de double liaison, le degré de rupture de simples liaisons par rapport aux ruptures de liaison totales étant d'au moins 60 % dans les glycanes d'oligomannose, de façon à permettre le transport de ladite sulfamidase à travers la barrière hémato-encéphalique d'un mammifère, et ayant un rapport de la C α -formylglycine (FGly) à la sérine (Ser) au site actif qui est supérieur à 1, de façon à produire une activité catalytique dans le cerveau dudit mammifère.

30

7. Procédé de préparation d'une sulfamidase modifiée, ledit procédé comprenant :

a) la réaction d'une sulfamidase glycosylée avec un periodate de métal alcalin pendant une durée de pas plus de 4 h, et

35

b) la réaction de ladite sulfamidase avec un borohydrure de métal alcalin pendant une durée de pas plus de 2 h ;

- 3 -

de façon à modifier des fragments de glycane de la sulfamidase et réduire l'activité de la sulfamidase vis-à-vis des récepteurs de reconnaissance de glycane, tout en conservant l'activité catalytique de ladite sulfamidase, dans lequel ladite sulfamidase modifiée présente une activité catalytique dans le cerveau d'un mammifère.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel ledit borohydrure est utilisé à une concentration comprise entre 10 et 80 mM.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, dans lequel l'étape a) est conduite pendant une durée de pas plus de 3 h, telle que pas plus de 2 h, telle que pas plus de 1 h, telle qu'environ 0,5 h.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans lequel l'étape a) et l'étape b) sont conduites en séquence sans conduire une étape intermédiaire.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, dans lequel l'étape a) est en outre caractérisé par au moins l'un de, par exemple au moins deux, par exemple la totalité de i) à iii) :

i) ledit periodate de métal alcalin est le métaperiodate de sodium ;

ii) ledit periodate est utilisé à une concentration de pas plus de 20 mM, telle que pas plus de 15 mM, telle qu'environ 10 mM, et

iii) ladite réaction est conduite à une température comprise entre 0 et 22 °C, telle qu'une température de 0 à 8 °C, telle qu'une température de 0 à 4 °C, telle qu'environ 8 °C, telle qu'environ 0 °C.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, dans lequel l'étape b) est en

- 4 -

outre caractérisé par au moins l'un de, par exemple au moins deux, par exemple la totalité de i) à iv) :

- i) ledit borohydrure de métal alcalin étant le borohydrure de sodium ;
- 5 ii) ledit borohydrure est utilisé à une concentration de pas plus de 4 fois la concentration dudit periodate, telle que pas plus de 3 fois la concentration dudit periodate, telle que pas plus de 2,5 fois la concentration dudit periodate, telle que 0,5 à 4 fois la concentration dudit periodate ;
- 10 iii) ladite réaction est conduite pendant une durée de pas plus de 1,5 h, telle que pas plus de 1 h, telle que pas plus de 0,75 h, telle qu'environ 0,5 h, et
- 15 iv) ladite réaction est conduite à une température comprise entre 0 et 8 °C.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, comprenant en outre a2) l'inactivation de la réaction résultant de l'étape a), et/ou b2) l'inactivation de la réaction résultant de l'étape b).
- 20

14. Sulfamidase modifiée pouvant être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 13.
- 25

15. Sulfamidase modifiée ou composition de sulfamidase selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 14, pour utilisation en thérapie.

- 30 16. Sulfamidase modifiée ou composition de sulfamidase selon la revendication 15, pour utilisation dans le traitement d'un mammifère atteint d'une maladie du stockage lysosomal, en particulier la mucopolysaccharidose IIIA (MPS IIIA).