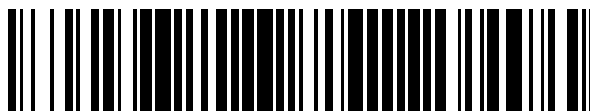


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 057**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04713966 .2**
96 Fecha de presentación: **24.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1618177**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Glucocerebrosidasa con alto contenido y de manosa y su producción en cultivo vegetal**

30 Prioridad:
27.04.2003 IL 15558803

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2012

73 Titular/es:
PROTALIX LTD. (100.0%)
2 SNUNIT STREET, SCIENCE PARK
20100 CARMIEL, IL

72 Inventor/es:
SHAALTIEL, YOSEPH;
BAUM, GIDEON;
BARTFELD, DANIEL;
HASHMUELI, SHARON y
LEWKOWICZ, AYALA

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 391 057 T3

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

DESCRIPCIÓN

Glucocerebrosidasa con alto contenido de manosa y su producción en cultivo vegetal

Campo de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones según se caracterizan en las reivindicaciones.

5 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Gaucher es el trastorno de almacenamiento lisosómico más frecuente. Se produce por un trastorno genético recesivo (cromosoma 1 q21-q31) que produce deficiencia de glucocerebrosidasa, también conocida como glucosilceramidasa, que es una enzima lisosómica unida a la membrana que cataliza la hidrólisis del glucoesfingolípido glucocerebrósido (glucosilceramida, GlcCer) a glucosa y ceramida. La enfermedad de Gaucher se produce por mutaciones puntuales en el gen hGCD (glucocerebrosidasa humana) (GBA), que producen acumulación de GlcCer en los lisosomas de macrófagos. Las células de almacenamiento características, llamadas células de Gaucher, se encuentran en el hígado, el bazo y la médula ósea. Los síntomas clínicos asociados incluyen hepatoesplenomegalia grave, anemia, trombocitopenia y deterioro esquelético.

El gen que codifica GCD humana fue secuenciado por primera vez en 1985 (6). La proteína consiste en 497 aminoácidos derivados de un pro-péptido 536-mero. La hGCD madura contiene cinco secuencias consenso de aminoácidos de N-glucosilación (Asn-X-Ser/Thr). Cuatro de estos sitios están normalmente glucosilados. La glucosilación del primer sitio es esencial para la producción de proteína activa. Se han identificado cadenas de oligosacáridos tanto con alto contenido de manosa como complejas (7). La hGCD de placenta contiene 7% de hidrato de carbono, 20% del cual es del tipo con alto contenido de manosa (8). Los estudios bioquímicos y de mutagénesis dirigida a sitio han proporcionado un mapa inicial de regiones y residuos importantes para el plegamiento, interacción de activadores y localización de sitios activos (9).

El tratamiento de hGCD placentaria con neuraminidasa (dando una asialo-enzima) produce un aumento de las tasas de eliminación y captación por células de hígado de rata con un aumento concomitante en actividad enzimática hepática (Furbish y col., 1981, Biochim. Biophys. Acta 673:425-434). Esta hGC placentaria modificada con glucanos se usa actualmente como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedad de Gaucher. Los estudios bioquímicos y de mutagénesis dirigida a sitio han proporcionado un mapa inicial de regiones y residuos importantes para el plegamiento, interacción de activadores y localización de sitios activos [Grace y col., J. Biol. Chem. 269:2283-2291 (1994)].

Hay tres tipos diferentes de enfermedad de Gaucher, cada uno determinado por el nivel de actividad de hGC. Las principales células afectadas por la enfermedad son los macrófagos, que se agrandan altamente debido a la acumulación de GlcCer y, por tanto, se denominan "células de Gaucher".

La identificación de un defecto en GCD como causa primaria de la enfermedad de Gaucher condujo al desarrollo de terapia de sustitución de enzimas como estrategia terapéutica para este trastorno.

De Duve sugirió primero que la sustitución de la enzima lisosómica ausente con enzima exógena biológicamente activa podría ser un enfoque viable para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico [Fed Proc. 23:1045 (1964)].

Desde entonces, diversos estudios han sugerido que la terapia de sustitución de enzimas puede ser beneficiosa para tratar diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico. El mejor éxito se ha mostrado con individuos con enfermedad de Gaucher de tipo I que se trataron con enzima exógena (β -glucocerebrosidasa), preparada a partir de placenta (Ceredasa™) o, más recientemente, recombinantemente (Cerezyme™).

La glucocerebrosidasa sin modificar derivada de fuentes naturales es una glucoproteína con cuatro cadenas de hidratos de carbono. Esta proteína no elige como diana las células fagocíticas en el cuerpo y, por tanto, es de valor terapéutico limitado. En el desarrollo de la presente terapia para enfermedad de Gaucher, los azúcares terminales en las cadenas de hidratos de carbono de glucocerebrosidasa se eliminan secuencialmente mediante tratamiento con tres glucosidasas diferentes. Este tratamiento con glucosidasas produce una glucoproteína cuyos azúcares terminales consisten en residuos de manosa. Como los fagocitos tienen receptores de manosa que reconocen glucoproteínas y glucopéptidos con cadenas de oligosacáridos que terminan en residuos de manosa, la remodelación de hidratos de carbono de glucocerebrosidasa ha mejorado la elección como diana de la enzima para estas células [Furbish y col., Biochem. Biophys. Acta 673:425, (1981)].

Como se indica en el presente documento, la glucosilación desempeña una función crucial en la actividad de hGCD; por tanto, la desglucosilación de hGCD expresada en líneas celulares usando tanto tunicamicina (células Sf9) como mutaciones puntuales que abolen todos los sitios de glucosilación (tanto células Sf9 como COS-1) produce la pérdida completa de actividad enzimática. Además, se encontró que la hGCD expresada en *E. coli* era inactiva. Más investigación indicó la significancia de los diversos sitios de glucosilación para la actividad de proteína. Además de la función de glucosilación en la presente actividad de proteína, la enzima comercialmente producida contiene

modificaciones de secuencias de glucano que facilitan la administración específica de fármaco. Las proteínas glucosiladas son remodeladas tras la extracción para incluir sólo manosa que contiene secuencias de glucano.

5 La enzima GCD humana contiene 4 sitios de glucosilación y 22 lisinas. La enzima recombinantemente producida (Cerezyme™) se diferencia de la enzima placentaria (Ceredasa™) en la posición 495 en la que una arginina ha sido
 10 sustituida con una histidina. Además, la composición del oligosacárido se diferencia entre la GCD recombinante y la placentaria ya que la primera tiene más residuos de fucosa y N-acetil-glucosamina mientras que la última retiene una cadena con alto contenido de manosa. Como se menciona anteriormente, ambos tipos de GCD se tratan con tres glucosidasas diferentes (neuraminidasa, galactosidasa y P-N acetil-glucosaminidasa) para exponer manosas terminales, que permite elegir como diana células fagocíticas. Una preparación farmacéutica que comprende la
 15 enzima recombinantemente producida se describe en el documento US 5.549.892. Debe observarse que todas las referencias mencionadas se incorporan por este documento por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento.

15 Un inconveniente asociado al tratamiento con terapia de sustitución de enzima lisosómica existente es que la bioactividad *in vivo* de la enzima es indeseablemente baja, por ejemplo, debido a la baja captación, reducida elección como diana de lisosomas de las células específicas en las que se acumula el sustrato y una corta semivida *in vivo* funcional en los lisosomas.

20 Otro inconveniente importante de las terapias de enzimas recombinantes de GCD existentes es su gasto, que puede ser una gran carga económica para los sistemas sanitarios. El alto coste de estas enzimas recombinantes resulta de un complejo protocolo de purificación y de las cantidades relativamente grandes del agente terapéutico requeridas para los tratamientos existentes. Por tanto, hay una necesidad urgente de reducir el coste de GCD de manera que esta terapia que salva vidas pueda proporcionarse más asequiblemente a todos los que la requieran.

25 Las proteínas para uso farmacéutico se han producido tradicionalmente en sistemas de expresión de mamífero o bacterianos. En la pasada década se desarrolló un nuevo sistema de expresión en plantas. Esta metodología utiliza *Agrobacterium*, una bacteria que puede insertar moléculas de ADN monocatenarias (T-ADN) en el genoma de la planta. Debido a la relativa simplicidad de introducir genes para la producción a escala industrial de proteínas y péptidos, esta metodología está siendo cada vez más popular como un sistema de expresión de proteínas alternativo (1).

30 Aunque las modificaciones postraduccionales no existen en sistemas de expresión bacterianos, los sistemas de expresión derivados de plantas facilitan estas modificaciones que se sabe que son cruciales para la expresión y actividad de proteínas. Una de las principales diferencias entre el sistema de expresión de proteínas de mamífero y de plantas es la variación de las cadenas laterales de azúcar de proteína, producidas por las diferencias en las rutas biosintéticas. Se mostró que la glucosilación tenía un profundo efecto sobre la actividad, plegamiento, estabilidad, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tasa de eliminación de la sangre y potencial antigénico de proteínas. De ahí que cualquier producción de proteínas en plantas deba tener en consideración las posibles ramificaciones de la
 35 glucosilación de plantas.

40 La glucosilación de proteínas se divide en dos categorías: modificaciones N-ligadas y O-ligadas (2). Los dos tipos se diferencian en el aminoácido con el que el resto de glucano está unido – las N-ligadas están unidas a residuos de Asn, mientras que las O-ligadas están unidas a residuos de Ser o Thr. Además, las secuencias de glucano de cada tipo llevan rasgos caracterizadores únicos. De los dos tipos, la glucosilación N-ligada es la más abundante, y su efecto sobre la función de proteínas se ha estudiado ampliamente. Por otra parte, los glucanos O-ligados son relativamente escasos y está disponible menos información referente a su efecto sobre proteínas.

Resumen de la invención

45 La técnica anterior no enseña ni sugiere un dispositivo, sistema o procedimiento para producir selectivamente proteínas glucosiladas en cultivo vegetal. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere un dispositivo, sistema o procedimiento tal para producir proteínas con alto contenido de manosa en cultivo vegetal. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere un dispositivo, sistema o procedimiento para producir proteínas en cultivo vegetal mediante el retículo endoplasmático (RE). La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere un dispositivo, sistema o procedimiento tal para producir proteínas en cultivo vegetal mediante el retículo endoplasmático (RE) mientras que evitan el aparato de Golgi. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere un dispositivo, sistema o procedimiento tal para producir proteínas en cultivo vegetal usando una señal del RE para evitar el aparato de Golgi.
 50

La presente invención vence estas desventajas de la técnica anterior proporcionando las realizaciones según se caracterizan por las reivindicaciones.

55 Debe observarse que el término "cultivo vegetal" como se usa en el presente documento incluye cualquier tipo de célula vegetal transgénica y/o genéticamente manipulada de otro modo que se cultiva en cultivo. La manipulación genética puede ser opcionalmente permanente o transitoria. Preferentemente, el cultivo muestra células que no están ensambladas para formar una planta completa, de forma que al menos una estructura biológica de una planta no está presente. Opcionalmente y preferentemente, el cultivo puede mostrar una pluralidad de tipos diferentes de células vegetales, pero preferentemente el cultivo caracteriza un tipo particular de célula vegetal. Debe observarse

que opcionalmente los cultivos vegetales que muestran un tipo particular de célula vegetal pueden derivarse originariamente de una pluralidad de tipos diferentes de tales células vegetales.

5 Las células vegetales pueden cultivarse según cualquier tipo de procedimiento de cultivo adecuado que incluye, pero no se limita a, cultivo sobre una superficie sólida (tal como, por ejemplo, un recipiente o placa de cultivo de plástico) o en suspensión.

Más particularmente, la invención se refiere a células huésped, particularmente células de zanahoria suspendidas transgénicas, vectores y procedimientos para la expresión y producción de alto rendimiento de glucocerebrosidasa (GCD) con alto contenido de manosa biológicamente activa de SEC ID N^o: 8. La invención proporciona además composiciones para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico.

10 La presente invención también es de células huésped que comprenden nuevas composiciones de vector que permiten la producción eficiente de genes que codifican GCD de SEC ID N^o: 8.

15 Por tanto, la presente invención resuelve una necesidad que se sentía desde hace tiempo para una tecnología económicamente viable para producir proteínas que tienen requisitos de glucosilación particulares, tales como la glucosilación con alto contenido de manosa de enzimas lisosómicas tales como, por ejemplo, GCD. La presente invención puede resolver esta necesidad que se sentía desde hace tiempo usando cultivo de células vegetales.

20 Con el fin de explicar adicionalmente la presente invención, ahora se proporciona una breve explicación de la ruta biosintética de proteínas con alto contenido de manosa. La ruta de biosíntesis básica de glucanos N-ligados con alto contenido de manosa y complejos está altamente conservada entre todos los eucariotas. La biosíntesis empieza en el retículo endoplasmático (RE) con la transferencia del precursor del glucano de un vehículo de lípido de dolicol a un residuo de Asn específico sobre la proteína por la oligosacaril transferasa. El precursor se modifica posteriormente en el RE por las glucosidasas I y II y una manosidasa hipotética para dar las estructuras con alto contenido de manosa, similar al procedimiento que se produce en mamíferos.

25 Otras modificaciones de la secuencia del glucano para estructuras complejas e híbridas se producen en el Golgi. Tales modificaciones incluyen la eliminación de uno de los cuatro residuos de manosa por α -manosidasa I, la adición de un residuo de *N*-acetilglucosamina, la eliminación de los dos residuos de manosa adicionales por α -manosidasa II, la adición de *N*-acetilglucosamina y opcionalmente, en esta etapa, residuos de xilosa y fucosa pueden añadirse para dar glucanos N-ligados específicos para plantas. Después de la transferencia de xilosa y fucosa al núcleo, los N-glucanos de tipo complejo pueden procesarse adicionalmente por la adición de fucosa y galactosa terminal. Otras modificaciones pueden tener lugar durante el transporte de glucoproteínas.

30 Actualmente se usan varios enfoques en la técnica anterior para controlar y confeccionar a medida la glucosilación de proteínas en plantas, teniendo todas deficiencias significativas, particularmente en comparación con la presente invención. Una estrategia son enormes modificaciones, tales como inhibición completa de la glucosilación o eliminación de sitios de glucosilación de la cadena de péptidos. Sin embargo, este enfoque puede producir defectos estructurales. Un enfoque adicional implica la inactivación e introducción de enzimas de procesamiento de hidratos de carbono específicas. De nuevo, este enfoque es difícil y también puede tener efectos perjudiciales sobre las propias células vegetales.

35 La presente invención vence estas deficiencias de los enfoques de la técnica anterior usando una señal de RE y/o bloqueando la secreción del RE al aparato de Golgi.

40 Como se indica anteriormente, las proteínas transportadas por el sistema de endomembrana pasan primero al retículo endoplasmático. La señal de transporte necesaria para esta etapa se representa por una secuencia señal en el extremo N de la molécula, el llamado péptido señal. Tan pronto como este péptido señal ha cumplido su función, que es insertar la proteína precursora unida a él en el retículo endoplasmático, se fracciona proteolíticamente de la proteína precursora. En virtud de su función específica, este tipo de secuencia de péptidos señal se ha conservado a un alto grado durante la evolución en todas las células vivas, independientemente de si son bacterias, levaduras, hongos, animales o plantas.

45 Muchas proteínas vegetales, que se insertan en el retículo endoplasmático en virtud del péptido señal, no residen en el RE, pero son transportadas del retículo endoplasmático al Golgi y continúan circulando del Golgi a las vacuolas. Una clase de tales señales de clasificación para esta circulación son señales que residen en la parte del extremo C de la proteína precursora [Neuhaus y Rogers, (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:127-144]. Se espera que las proteínas que contienen tanto un péptido señal del extremo N para la inserción en el retículo endoplasmático como una señal que elige dianas vacuolares del extremo C contengan glucanos complejos, que están unidos a ellas en el Golgi [Lerouge y col., (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:31-48]. La naturaleza de tales señales de clasificación del extremo C pueden variar muy ampliamente. El documento US 6.054.637 describe fragmentos de péptidos obtenidos de la región de quitinasa básica de tabaco que es una proteína vacuolar que actúa de péptidos que eligen dianas vacuolares. Un ejemplo de una proteína vacuolar que contiene una señal que elige como diana el extremo C y glucanos complejos es la proteína de almacenamiento faseolina de semillas de judía [Frigerio y col., (1998) *Plant Cell* 10:1031-1042; Frigerio y col., (2001) *Plant Cell* 13:1109-1126.].

El paradigma es que en todas las células eucariotas las proteínas vacuolares pasan por el RE y el Golgi antes del secuestro en la vacuola como su destino final. Sorprendentemente, las células de la raíz vegetal transformadas de la presente invención produjeron una GCD con alto contenido de manosa inesperada. Ventajosamente, se encontró que este producto con alto contenido de manosa era biológicamente activo y, por tanto, no se necesitaron etapas adicionales para su activación. Opcionalmente, cualquier tipo de mecanismo que pueda producir glucosilación con alto contenido de manosa, que incluye cualquier tipo de mecanismo para evitar el Golgi, puede usarse según la presente invención.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped vegetal que produce GCD humana de SEC ID N°: 8. Esta célula puede transformarse o transfectarse con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica esta proteína de interés o con un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico. Tal molécula de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la anterior proteína de interés operativamente ligada a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige dianas vacuolares de SEC ID N°: 8. La primera secuencia de ácidos nucleicos puede estar opcionalmente adicionalmente operativamente ligada a una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige RE (retículo endoplasmático) como diana. La célula huésped de la invención se caracteriza porque la proteína de interés se produce por la célula en una forma altamente manosilada.

La célula huésped de la invención es una célula vegetal y, lo más preferentemente, una célula de raíz vegetal seleccionada del grupo que consiste en célula de raíz, célula de apio, célula de jengibre, célula de rábano picante y célula de zanahoria transformada por *Agrobacterium rhizogenes*.

En una realización preferida, la célula de raíz vegetal es una célula de zanahoria. Debe observarse que las células de zanahoria transformadas de la invención se cultivan en suspensión. Como se menciona anteriormente y se describe en los ejemplos, estas células se transformaron con las células de *Agrobacterium tumefaciens*.

En otra realización, la molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica GCD humana de SEC ID N°: 8 que está en enlace operable con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige dianas vacuolares derivadas del gen de quitinasa básica A de tabaco que tiene SEC ID N°: 2. Este péptido señal vacuolar tiene la secuencia de aminoácidos que se indica por SEC ID N°: 2. La primera secuencia de ácidos nucleicos puede estar opcionalmente adicionalmente ligada en un enlace operable con una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige RE (retículo endoplasmático) como diana que se indica por SEC ID N°: 1. En una realización, la molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende además un promotor que es funcional en células vegetales. Este promotor debería estar operativamente ligado a la molécula recombinante de la invención.

En otra realización, esta molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender opcionalmente además un terminador operativamente ligado que es preferentemente funcional en células vegetales. La molécula de ácido nucleico recombinante de la invención puede comprender opcionalmente además elementos de control, promotores y reguladores adicionales y/o marcadores de selección. Debe observarse que estos elementos reguladores están operativamente ligados a la molécula recombinante.

La proteína de interés con alto contenido de manosa anterior producida por la célula huésped de la invención puede ser una glucoproteína con alto contenido de manosa que tiene residuos de manosa terminales expuestos.

Tal proteína con alto contenido de manosa, la glucocerebrosidasa (GCD), es la glucocerebrosidasa humana (GCD) de SEC ID N°: 8. En lo sucesivo, GCD, rGCD, rhGCD recombinantes se refieren todas a diversas formas de GCD humana recombinante, a menos que se indique lo contrario.

Como se describe previamente, la enfermedad de Gaucher, el trastorno de almacenamiento lisosómico más frecuente, se produce por mutaciones puntuales en el gen hGCD (glucocerebrosidasa humana) (GBA), que produce la acumulación de GlcCer en los lisosomas de macrófagos. La identificación de la deficiencia de GCD como causa primaria de enfermedad de Gaucher condujo al desarrollo de terapia de sustitución de enzimas como estrategia terapéutica para este trastorno. Sin embargo, la glucosilación desempeña una función crucial en la actividad de hGCD y la captación para células diana.

Por tanto, según otras realizaciones preferidas de la presente invención, se proporciona hGCD adecuadamente glucosilada controlando la expresión de hGCD en cultivo de células vegetales, proporcionándose una señal de RE. La hGCD anterior tiene al menos una cadena de oligosacáridos que comprende un residuo de manosa expuesto para el tratamiento o la prevención de enfermedad de Gaucher.

Todavía más, en una realización particular, esta célula huésped preferida se transforma o se transfecta por una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende además un promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, un terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* y elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico el tabaco). Según una realización preferida, esta molécula de ácido nucleico recombinante comprende la secuencia de ácidos nucleicos que se indica sustancialmente por SEC ID N°: 13 y codifica una GCD con alto contenido de manosa que tiene la secuencia de aminoácidos que se indica

sustancialmente por SEC ID Nº: 14.

Debe apreciarse que la presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima lisosómica biológicamente activa, que es codificada por SEC ID Nº: 8.

5 En una realización preferida, el vector de expresión de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una glucocerebrosidasa humana (GCD) con alto contenido de manosa biológicamente activa. Preferentemente, este vector de expresión preferido comprende una molécula de ácido nucleico recombinante nucleica que tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se indica sustancialmente por SEC ID Nº: 13.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una proteína con alto contenido de manosa recombinante como se ha producido anteriormente por la célula huésped de la invención.

Esta proteína con alto contenido de manosa es una enzima lisosómica con alto contenido de manosa biológicamente activa que es glucocerebrosidasa humana (GCD) de SEC ID Nº: 8.

Todavía más, la invención proporciona dicha GCD humana con alto contenido de manosa biológicamente activa recombinante que tiene al menos una cadena de oligosacáridos que comprende un residuo de manosa expuesto.

15 Según una realización preferida, la GCD humana recombinante de la invención pueden unirse a un receptor de manosa sobre una célula diana en un sitio diana. Preferentemente, este sitio puede estar dentro de un sujeto que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

20 Debe observarse que la enzima lisosómica recombinante tiene elevada afinidad por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica que se produce naturalmente para la célula diana. En una realización específica, la célula diana en el sitio diana puede ser una célula de Kupffer en el hígado del sujeto.

25 El procedimiento de preparación de la GCD como antes comprende las etapas de: (a) preparar un cultivo de células vegetales huésped recombinantes transformadas o transfectadas con moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que codifican la proteína recombinante de interés o con un vector de expresión que comprende las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes; (b) cultivar este cultivo de células huésped preparado por la etapa (a) en condiciones que permitan la expresión de la proteína, en el que las células huésped producen la proteína en una forma altamente manosilada; (c) recuperar la proteína de las células y recoger las células del cultivo proporcionado en (a); y (d) purificar la proteína de la etapa (c) por un procedimiento de purificación de proteínas adecuado.

30 Esta enzima recombinante como antes pueden unirse a un receptor de manosa sobre una célula diana en un sitio diana. Más particularmente, la enzima recombinante producida tiene elevada afinidad por la célula diana, en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica que se produce naturalmente para la célula diana. Por consiguiente, la célula diana en el sitio diana puede ser célula de Kupffer en el hígado del sujeto.

35 En otra realización preferida, la célula huésped usada mediante el procedimiento de la invención puede ser una célula de raíz vegetal seleccionada del grupo que consiste en célula de raíz, célula de apio, célula de jengibre, célula de rábano picante y célula de zanahoria transformada por *Agrobacterium rhizogenes*. Lo más preferentemente, la célula de raíz vegetal es una célula de zanahoria. Debe observarse particularmente que en el procedimiento de la invención las células de zanahoria huésped transformadas se cultivan en suspensión.

40 La invención proporciona además una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende como principio activo la enzima lisosómica con alto contenido de manosa biológicamente activa recombinante como se define por la invención. La composición de la invención puede comprender opcionalmente además diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición de la invención está prevista para el tratamiento de enfermedad de Gaucher.

La invención se refiere además al uso de una GCD humana con alto contenido de manosa biológicamente activa recombinante como antes en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedad de Gaucher.

45 Por consiguiente, esta enzima lisosómica biológicamente activa es una glucocerebrosidasa humana (GCD) con alto contenido de manosa biológicamente activa de SEC ID Nº: 8 como se define por la invención.

50 Según la presente invención, se proporciona una célula huésped que produce una proteína con alto contenido de manosa recombinante que comprende un polinucleótido que codifica la proteína recombinante y una señal para hacer que la proteína recombinante se produzca como una proteína con alto contenido de manosa. Preferentemente, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés operativamente ligada a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal. Opcionalmente, el péptido señal comprende un péptido señal que elige RE (retículo endoplasmático) como diana. El polinucleótido comprende además una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige dianas vacuolares.

La señal hace que la proteína recombinante sea elegida como diana para el RE. Más preferentemente, la señal comprende un péptido señal que hace que la proteína recombinante sea elegida como diana para el RE. Preferentemente, el polinucleótido comprende un segmento de ácido nucleico que codifica el péptido señal.

5 Opcionalmente y preferentemente, la señal hace que la proteína recombinante evite el Golgi. Preferentemente, la señal comprende un péptido señal que hace que la proteína recombinante no sea elegida como diana para el Golgi. Más preferentemente, el polinucleótido comprende un segmento de ácido nucleico que codifica el péptido señal.

10 Opcionalmente y preferentemente, la célula huésped es una cualquiera de una célula eucariota y procariota. Opcionalmente, la célula procariota es una célula bacteriana, preferentemente una célula de *Agrobacterium tumefaciens*. La célula eucariota es una célula vegetal. Más preferentemente, la célula vegetal es una célula de raíz vegetal seleccionada del grupo que consiste en célula de raíz, célula de apio, célula de jengibre, célula de rábano picante y célula de zanahoria transformada por *Agrobacterium rhizogenes*. Lo más preferentemente, la célula de raíz vegetal es una célula de zanahoria.

15 El polinucleótido recombinante comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 8 que está en enlace operable con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige dianas vacuolares derivadas del gen de la quitinasa básica A de tabaco, péptido señal vacuolar que tiene la secuencia de aminoácidos que se indica por SEC ID N°: 2, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos está opcionalmente adicionalmente operativamente ligada a una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige RE (retículo endoplasmático) como diana que se indica por SEC ID N°: 1.

20 Más preferentemente, el polinucleótido recombinante comprende además un promotor que es funcional en células vegetales, en el que el promotor está operativamente ligado a la molécula recombinante.

Lo más preferentemente, el polinucleótido recombinante comprende además un terminador que es funcional en células vegetales, en el que el terminador está operativamente ligado a la molécula recombinante.

25 También más preferentemente, el polinucleótido recombinante comprende opcionalmente además elementos de control, promotores y reguladores adicionales y/o marcadores de selección, en el que los elementos reguladores están operativamente ligados a la molécula recombinante.

La proteína con alto contenido de manosa de la invención es una glucoproteína con alto contenido de manosa que tiene glucosilación con al menos un residuo de manosa expuesto.

La GCD comprende la secuencia de aminoácidos que se indica por SEC ID N°: 8, codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que se indica por SEC ID N°: 7.

30 Más preferentemente, la célula se transforma o transfecta con un polinucleótido recombinante o con un vector de expresión que comprende la molécula, polinucleótido recombinante que comprende además un promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, un terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, y el elemento regulador es el elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico el tabaco), y que tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se indica sustancialmente por SEC ID N°: 13 que codifica GCD que tiene la secuencia de aminoácidos que se indica sustancialmente por SEC ID N°: 14.

35 Según realizaciones preferidas, se proporciona la proteína con alto contenido de manosa recombinante de la invención producida por la célula huésped descrita anteriormente.

40 Se proporciona una proteína GCA humana con alto contenido de manosa recombinante como se define por SEC ID N°: 8 producida en cultivo de células vegetales. Preferentemente, la proteína muestra un péptido señal vegetal para elegir como diana una proteína para el RE.

Más preferentemente, el péptido señal vegetal comprende un péptido para elegir como diana la proteína para el RE en un cultivo de células vegetales de raíz. Lo más preferentemente, el cultivo de células vegetales de raíz comprende células de zanahoria.

45 Según otras realizaciones preferidas más se proporciona el uso de un cultivo de células vegetales para producir una GCD con alto contenido de manosa humana como se define por SEC ID N°: 8.

El procedimiento de producir la proteína con alto contenido de manosa de la invención comprende preparar un cultivo de células huésped recombinantes transformadas o transfectadas con un polinucleótido recombinante que codifica una proteína recombinante; cultivar el cultivo de células huésped en condiciones que permitan la expresión de la proteína, en el que las células huésped producen la proteína en una forma altamente manosilada.

50 Preferentemente, el cultivo de células huésped se cultiva en suspensión. Más preferentemente, el procedimiento comprende además purificar la proteína.

El procedimiento se realiza con la célula huésped como se describe previamente.

Preferentemente, la enzima lisosómica está seleccionada del grupo que consiste en glucocerebrosidasa (GCD), esfingomielinasa ácida, hexosaminidasa, α -N-acerilgalactosamina, lipasa ácida, α -galactosidasa, glucocerebrosidasa, α -L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, α -manosidasa y sialidasa.

5 La enzima lisosómica es glucocerebrosidasa (GCD) de SEC ID N^o: 8 Lo más preferentemente, la célula diana en el sitio diana es célula de Kupffer en el hígado del sujeto.

Preferentemente, la célula huésped es una célula de raíz vegetal seleccionada del grupo que consiste en célula de raíz, célula de apio, célula de jengibre, célula de rábano picante y célula de zanahoria transformada por *Agrobacterium rhizogenes*.

Más preferentemente, la célula de raíz vegetal es una célula de zanahoria.

10 Lo más preferentemente, las células de zanahoria huésped transformadas se cultivan en suspensión.

La enzima recombinante de la invención pueden unirse a un receptor de manosa sobre una célula diana en un sitio diana dentro de un sujeto. Más preferentemente, la enzima lisosómica recombinante de la invención tiene elevada afinidad por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica que se produce naturalmente para la célula diana. La enzima lisosómica es glucocerebrosidasa (GCD) de SEC ID N^o: 8.

15 La enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Gaucher. También más preferentemente, la célula diana en el sitio diana es una célula de Kupffer en el hígado del sujeto.

20 Según otras realizaciones más se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende como principio activo una enzima lisosómica con alto contenido de manosa biológicamente activa recombinante como se ha descrito anteriormente, composición que opcionalmente comprende además diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Gaucher. La enzima lisosómica recombinante es una glucocerebrosidasa (GCD) humana con alto contenido de manosa biológicamente activa de SEC ID N^o: 8.

25 Según otras realizaciones preferidas más se proporciona el uso de una enzima lisosómica con alto contenido de manosa biológicamente activa recombinante de la invención como se ha descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedad de Gaucher.

La invención se describirá adicionalmente mediante las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

30 Figura 1A-1B
1A muestra el casete de expresión resultante que comprende el promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico el tabaco), señal que elige RE como diana, la secuencia de GCD humana (también denotada por SEC ID N^o: 7), señal vacuolar y secuencia del terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

35 1B muestra un mapa esquemático del esqueleto del plásmido pGreenII.
La Figura 2 muestra el análisis de transferencia Western de extractos de célula transformados por hGCD usando anticuerpo específico anti-hGCD. Se usó Cerezyme patrón (carril 1) como control positivo, se usó callo sin transformar como control negativo (carril 2), se muestran diversos extractos de callos seleccionados en los carriles 3-8.

40 La Figura 3A-3C muestra la primera etapa de purificación de rhGCD sobre una resina de intercambio catiónico fuerte (soporte Macro-Prep High-S, Bio-Rad), empaquetada en una columna XK (2,6 x 20 cm). La columna se integró con un sistema AKTA-Prime (Amersham Pharmacia Biotech) que permite la monitorización de la conductividad, pH y absorbancia a 280 nm. La elución de la rh-GCD se obtuvo con tampón de equilibrio que contiene NaCl 600 mM.

45 La Fig. 3A representa una ejecución convencional de esta etapa de purificación. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática, como se muestra por la Fig. 3B, y se agruparon los tubos que presentaron actividad enzimática (en el pico de elución). La Fig. 3C muestra la tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas para actividad.

50 Las Figuras 3D-3F muestran gráficas correspondientes a las de las Figuras 3A-3C, pero para la segunda columna.

55 La Figura 4A-C muestra la etapa de purificación final de la hGCD recombinante sobre una resina de interacción hidrófoba (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, Tosoh Corp.), empaquetada en una columna XK (2,6 x 20 cm). La columna se integró con una sistema AKTA-Prime (Amersham Pharmacia Biotech) que permite la monitorización de la conductividad, pH y absorbancia a 280 nm. El conjunto de elución de GCD de la columna previa se cargó a 6 ml/min, seguido de lavado con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia UV alcanza la referencia. La GCD pura se eluyó por tampón cítrico 10 mM que contenía 50% de etanol.

La Fig. 4A representa una ejecución convencional de este etapa de purificación.

La Fig. 4B muestra las fracciones recogidas durante la ejecución que se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática.

La Fig. 4C muestra tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas para actividad.

5 La Figura 5 muestra la actividad de hGCD recombinante tras la captación por macrófagos peritoneales (Figuras 5A-5C), mientras que la Figura 5D muestra una transferencia Western de GCD recombinante según la presente invención.

La Figura 6 muestra estructuras de glucosilación comparativas para rGCD según la presente invención y las de Cerezyme™.

10 La Figura 7 muestra estructuras de glucosilación para rGCD según la presente invención.

La Figura 8 muestra estructuras de glucosilación de N-glucano adicionales para rGCD según la presente invención.

Descripción detallada de la invención

15 Las proteínas para uso farmacéutico se han producido tradicionalmente en sistemas de expresión de mamífero o bacterianos. En los últimos años se encontró un nuevo sistema de expresión prometedor en plantas. Debido a la relativa simplicidad de introducir nuevos genes y las posibilidades de producción a gran escala de proteínas y péptidos, la 'farmicultura molecular' se está volviendo cada vez más popular como sistema de expresión de proteínas.

20 Una de las principales diferencias entre el sistema de expresión de proteínas de mamífero y de planta es la variación de secuencias de glucosilación de proteínas producida por las diferencias en las rutas biosintéticas. Se mostró que la glucosilación tenía un profundo efecto sobre la actividad, plegamiento, estabilidad, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, tasa de eliminación de la sangre y potencial antigénico de proteínas. De ahí que cualquier producción de proteína en plantas deba tener en cuenta las posibles ramificaciones de la glucosilación de plantas.

25 El resto de hidrato de carbono es una de las modificaciones postraduccionales más comunes de proteínas. La glucosilación de proteínas se divide en dos categorías: N-ligada y O-ligada. Los dos tipos se diferencian en el aminoácido con el que el resto de glucano está unido – las N-ligadas están unidas a residuos de Asn, mientras que las O-ligadas están unidas a residuos de Ser o Thr. Además, las secuencias de glucano de cada tipo llevan rasgos caracterizadores únicos. De los dos tipos, la glucosilación N-ligada es la más abundante, y su efecto sobre las proteínas se ha estudiado ampliamente. Por otra parte, los glucanos O-ligados son relativamente escasos y está disponible menos información referente a su influencia sobre proteínas. La mayoría de los datos disponibles sobre la glucosilación de proteínas en plantas se basan en glucanos N-ligados, en vez de O-ligados.

30 La presente invención describe en el presente documento un sistema de expresión vegetal basado en células vegetales transgénicas que son preferentemente células de raíz, opcionalmente y preferentemente cultivadas en suspensión. Este sistema de expresión está particularmente diseñado para la eficiente producción de GCD humana de SEC ID N°: 8. El término "con alto contenido de manosa" incluye glucosilación que tiene al menos un residuo de manosa expuesto.

35 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que produce GCD humana de SEC ID N°: 8. Preferentemente, la proteína recombinante muestra un péptido señal del RE (retículo endoplasmático), más preferentemente un péptido señal que elige RE como diana. Alternativamente o adicionalmente, la proteína recombinante muestra una señal que produce la proteína para evitar el Golgi. La señal permite preferentemente que esta proteína recombinante muestre glucosilación con alto contenido de manosa, más preferentemente reteniendo tal glucosilación, y lo más preferentemente eligiendo como diana el RE y/o evitando el Golgi. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, una señal tal se implementa como un péptido señal de SEC ID N°: 2, que forma parte de la secuencia de proteínas. Debe observarse que la señal es una señal que elige diana es

Los péptidos señal que eligen RE como diana son muy conocidos en la técnica; son péptidos señal del extremo N. Opcionalmente, cualquier péptido señal que elige RE como diana adecuado puede usarse con la presente invención.

40 Una célula huésped vegetal según la presente invención puede transformarse o transfectarse opcionalmente (permanentemente y/o transitoriamente) con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la GCD de SEC ID N°: 8 o con un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico. Tal molécula de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica la GCD de SEC ID N°: 8 operativamente ligada a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige dianas vacuolares de SEC ID N°: 2. Debe observarse que, como se usa en el presente documento, el término "operablemente" ligado no se refiere necesariamente a un enlace físico. La primera secuencia de ácidos nucleicos puede opcionalmente y preferentemente estar adicionalmente operativamente ligada a una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige RE (retículo endoplasmático) como diana. La célula huésped de la invención se caracteriza porque la proteína de interés se produce por la célula en una forma que incluye al menos un residuo de manosa expuesto, pero es preferentemente una forma altamente manosilada.

“Células”, “células huésped” o “células huésped recombinantes” son términos usados indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a células particulares del sujeto, sino a la progenie o posible progenie de una célula tal. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en la generación sucesiva debido tanto a mutación como a influencias medioambientales, tal progenie puede, en realidad, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término como se usa en el presente documento. “Célula huésped” como se usa en el presente documento se refiere a células que pueden transformarse recombinantemente con ADN desnudo o vectores de expresión contruidos usando técnicas de ADN recombinante. Como se usa en el presente documento, el término “transfección” significa la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, ADN desnudo o un vector de expresión, en una célula receptora por transferencia génica mediada por ácido nucleico. “Transformación”, como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento en el que un genotipo de célula cambia como resultado de la captación celular de ADN o ARN exógeno y, por ejemplo, la célula transformada expresa una forma recombinante de la proteína deseada.

Debe apreciarse que una resistencia a fármaco u otro marcador de selección están previstos en parte para facilitar la selección de los transformantes. Adicionalmente, la presencia de un marcador de selección, tal como marcador de resistencia a fármaco, puede ser de uso en evitar que los microorganismos contaminantes se multipliquen en el medio de cultivo. Un cultivo puro tal de la célula huésped transformada se obtendría cultivando las células en condiciones que se requieren para la supervivencia del fenotipo inducido.

Como se indica anteriormente, las células vegetales huésped de la invención pueden transfectarse o transformarse con una molécula de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando corresponda, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que los términos incluyen, como equivalentes, análogos de tanto ARN como ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos y, según sea aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tal como sentido o antisentido) y bicatenarios.

La célula huésped vegetal de la invención puede transfectarse o transformarse con un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante. “Vectores de expresión”, como se usa en el presente documento, engloba vectores tales como plásmidos, virus, bacteriófago, fragmentos de ADN integrable y otros vehículos que permiten la integración de fragmentos de ADN en el genoma del huésped. Los vectores de expresión son normalmente construcciones de ADN o ARN auto-replicas que contienen el gen deseado o sus fragmentos, y elementos de control genéticos operativamente ligados son reconocidos en una célula huésped adecuada y efectúan la expresión de los genes deseados. Estos elementos de control pueden efectuar la expresión dentro de un huésped adecuado. Generalmente, los elementos de control genéticos pueden incluir un sistema de control de la expresión de promotores eucariota. Tal sistema incluye normalmente un promotor de la transcripción, un operador opcional para controlar la aparición de la transcripción, potenciadores de la transcripción para elevar el nivel de expresión de ARN, una secuencia que codifica un sitio de unión a ribosoma adecuado, uniones de corte y empalme de ARN, secuencias que terminan la transcripción y traducción, etc. Los vectores de expresión normalmente contienen un origen de replicación que permite que el vector se replique independientemente de la célula huésped.

Los plásmidos son la forma de vector más comúnmente usada, pero otras formas de vectores que sirven a una función equivalente y que son, o que se hacen, conocidos en la técnica son adecuados para su uso en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Pouwels y col. Cloning Vectors: a Laboratory Manual (1985 y suplementos), Elsevier, N.Y.; y Rodriguez y col. (eds.) Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses, Butterworth, Boston, Mass (1988), que se incorporan en el presente documento por referencia.

En general, tales vectores contienen además genes específicos que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. También se contempla el uso de vectores de expresión víricos procariotas y eucariotas para expresar los genes que codifican los polipéptidos de la presente invención.

Opcionalmente, el vector puede ser un vector vegetal general (como se describe con respecto a los ejemplos más adelante). Alternativamente, el vector puede ser opcionalmente específico para células de raíz.

La célula huésped de la invención es una célula vegetal y, lo más preferentemente, una célula de raíz vegetal seleccionada del grupo que consiste en célula de raíz vegetal, célula de apio, célula de jengibre, célula de rábano picante y célula de zanahoria transformada por *Agrobacterium rhizogenes*.

En una realización preferida, la célula de raíz vegetal es una célula de zanahoria. Debe observarse que las células de zanahoria transformadas de la invención se cultivan en suspensión. Como se ha mencionado anteriormente y se describe en los ejemplos, estas células se transformaron con las células de *Agrobacterium tumefaciens* de la invención.

Los vectores de expresión o moléculas de ácidos nucleicos recombinantes usados para transfectar o transformar las células huésped de la invención pueden modificarse adicionalmente según procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia para añadir, eliminar o modificar de otro modo secuencias señal de péptidos para alterar la escisión del péptido señal o para aumentar o cambiar la elección de diana de la enzima lisosómica expresada mediante el sistema de endomembrana vegetal. La construcción de expresión se manipula específicamente para

elegir como diana la enzima lisosómica para la localización vacuolar.

El vector de expresión o molécula de ácido nucleico recombinante se manipula para incorporar una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de SEC ID N°: 2 que elige como diana la enzima lisosómica para la vacuola vegetal. La molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica GCD humana de SEC ID N°: 8 que está en enlace operable con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige dianas vacuolares derivadas del gen de la quitinasa básica A de tabaco. Este péptido señal vacuolar tiene la secuencia de aminoácidos que se indica por SEC ID N°: 2. La primera secuencia de ácidos nucleicos puede estar opcionalmente adicionalmente ligada en un enlace operable con una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal que elige RE (retículo endoplasmático) como diana que se indica por SEC ID N°: 1. En una realización, la molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende además un promotor que es funcional en células vegetales. Este promotor debería estar operativamente ligado a la molécula recombinante de la invención.

El término "operativamente ligada" se usa en el presente documento para indicar que una primera secuencia de ácidos nucleicos está operativamente ligada con una segunda secuencia de ácidos nucleicos en la que la primera secuencia de ácidos nucleicos está dispuesta en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Opcionalmente y preferentemente, las secuencias de ADN operativamente ligadas son contiguas (por ejemplo, ligadas físicamente) y, si fuera necesario para unir dos regiones codificantes de la proteína, en el mismo marco de lectura. Por tanto, una secuencia de ADN y una secuencia(s) reguladora(s) están conectadas de tal forma que permiten la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a la(s) secuencia(s) reguladora(s).

En otra realización, esta molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender opcionalmente además un terminador operativamente ligado que es preferentemente funcional en células vegetales. La molécula de ácido nucleico recombinante de la invención puede comprender opcionalmente además elementos de control, promotores y reguladores adicionales y/o marcadores de selección. Debe observarse que estos elementos reguladores están operativamente ligados a la molécula recombinante.

Elementos reguladores que pueden usarse en las construcciones de expresión incluyen promotores que pueden ser tanto heterólogos como homólogos a la célula vegetal. El promotor puede ser un promotor vegetal o un promotor no vegetal que puede activar altos niveles transcripción de una secuencia ligada en células vegetales y plantas. Ejemplos no limitantes de promotores vegetales que pueden usarse eficazmente en la práctica de la invención incluyen el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) ³⁵S, rbcS, el promotor para la proteína de unión a clorofila a/b, Adh1, NOS y HMG2, o modificaciones o derivados de los mismos. El promotor puede ser tanto constitutivo como inducible. Por ejemplo, y no a modo de limitación, un promotor inducible puede ser un promotor que promueve la expresión o expresión elevada de la secuencia de nucleótidos de la enzima lisosómica después de la activación mecánica de genes (MGA) de la planta, tejido vegetal o célula vegetal.

Los vectores de expresión usados para transfectar o transformar las células huésped de la invención pueden modificarse adicionalmente según procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia para potenciar u optimizar la expresión génica heteróloga en plantas y células vegetales. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, mutar elementos reguladores de ADN para aumentar la fuerza del promotor o para alterar la proteína de interés.

Las enzimas lisosómicas solubles comparten etapas iniciales de la biosíntesis con las proteínas secretoras, es decir, síntesis sobre el ribosoma, unión del péptido señal del extremo N a la superficie del retículo endoplasmático (RE) rugoso, transporte en la luz del RE cuando el péptido señal se escinde y adición de oligosacáridos a residuos de asparagina específicos (N-ligados), seguido de más modificaciones de la proteína naciente en el aparato de Golgi [von Figura y Hasilik, Annu. Rev. Biochem. 55:167-193 (1986)]. Los oligosacáridos N-ligados pueden ser complejos, diversos y heterogéneos, y pueden contener residuos con alto contenido de manosa. Las proteínas se someten adicionalmente a procesamiento en un compartimento pos-RE, pre-Golgi y en el cis-Golgi para formar tanto una señal de reconocimiento dependiente de oligosacáridos de 6-fosfato de manosa N-ligados (M-6-P) como independiente de oligosacáridos de M-6-P N-ligados para enzimas lisosómicas localizadas [Kornfeld & Mellman, Ann. Rev. Cell Biol., 5:483-525 (1989); Kaplan y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2026 (1977)]. La presencia de la señal de reconocimiento de M-6-P produce la unión de la enzima a receptores de M-6-P (MPR). Estas enzimas unidas permanecen en la célula, se encapsidan eventualmente en lisosomas y, por tanto, son segregadas de proteínas elegidas como diana para la secreción o a la membrana plasmática.

Todavía más, en una realización particular, esta célula huésped vegetal preferida se transforma o transfecta por una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende además un promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, preferentemente que tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se indica por SEC ID N°: 9, un terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, preferentemente que tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se indica por SEC ID N°: 12, y elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico el tabaco). Según una realización preferida, este molécula de ácido nucleico recombinante comprende la secuencia de ácidos

nucleicos que se indica sustancialmente por SEC ID N°: 13 y codifica una GCD con alto contenido de manosa que tiene la secuencia de aminoácidos que se indica sustancialmente por SEC ID N°: 14.

5 El vector de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una glucocerebrosidasa humana (GCD) con alto contenido de manosa biológicamente activa de SEC ID N°: 8. Preferentemente, este vector de expresión preferido comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que tiene la secuencia de ácidos nucleicos que se indica sustancialmente por SEC ID N°: 13. Según una realización específica, un vector de expresión preferido utiliza el plásmido pGREEN II como se describe por el siguiente Ejemplo 1.

Un casete de expresión puede estar comprendido dentro del vector de expresión anteriormente descrito.

10 El término "biológicamente activa" se usa en el presente documento con respecto a cualquier enzima lisosómica recombinante producida en un sistema de expresión vegetal para indicar que la enzima lisosómica recombinante puede hidrolizar tanto sustrato natural, o un análogo, como sustrato sintético de la enzima lisosómica humana o animal correspondiente a niveles detectables.

La GCD humana recombinante de SEC ID N°: 8 puede unirse a un receptor de manosa sobre una célula diana, en un sitio diana. Este sitio puede estar dentro de un sujeto que padece enfermedad de Gaucher.

15 Opcionalmente y más preferentemente, la enzima lisosómica recombinante como se define anteriormente tiene elevada afinidad por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica que se produce naturalmente para la célula diana. En una realización específica, la célula diana en el sitio diana puede ser una célula de Kupffer en el hígado del sujeto.

20 Opcionalmente, la proteína recombinante puede producirse por células vegetales según la presente invención cultivando en un dispositivo descrito con respecto a la patente de EE.UU. n° 6.391.638 concedida el 21 de mayo de 2002 e incorporada por este documento por referencia como si se expusiera completamente en el presente documento. Condiciones para cultivar células vegetales en suspensión con este dispositivo se describen con respecto a la solicitud de patente de EE.UU. titulada "CELL/TISSUE CULTURING DEVICE, SYSTEM AND METHOD" por uno de los presentes inventores y de propiedad común con la presente solicitud, que se presentó el
25 mismo día que la presente solicitud.

Los ejemplos muestran que una h-GCD recombinante producida por la invención se unió inesperadamente a la membrana interna de las células de zanahoria transformadas de la invención y no se secretó al medio. La rh-GCD soluble puede separarse de residuos de células y otro componente insoluble según medios conocidos en la técnica tales como filtración o precipitación. Por ejemplo, tras un ciclo de congelación-descongelación, las células
30 experimentan rotura y liberación de las proteínas solubles intracelulares, mientras que la h-GCD sigue unida al residuo de membrana insoluble. Esta mezcla de residuos de membrana solubles e insolubles se centrifugó a continuación y la fracción soluble se eliminó, simplificándose así la purificación. La membrana unida h-GCD puede entonces disolverse por rotura mecánica en presencia de un detergente suave, inhibidores de proteasa y reactivo de oxidación neutralizante. La enzima soluble puede purificarse adicionalmente usando técnicas de cromatografía tales como columnas de cromatografía de intercambio catiónico y de interacción hidrófoba. Durante la producción de rh-GCD en el biorreactor y el procedimiento de purificación, la identidad, rendimiento, pureza y actividad enzimática de h-GCD puede determinarse por uno o más ensayos bioquímicos que incluyen, pero no se limitan a, detectar la hidrólisis del sustrato de la enzima o un sustrato análogo, análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y análisis inmunológicos tales como ELISA y transferencia Western.

40 En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

45 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las forma en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente de otro modo.

Debe observarse que el término "tratamiento" también incluye mejora o alivio de una afección patológica y/o uno o más síntomas de la misma, cura de una afección tal o prevención de la génesis de una afección tal.

50 La enfermedad de Gaucher es la enfermedad de almacenamiento lisosómico más común en seres humanos, con la mayor frecuencia encontrada en la población judía de Ashkenazi. Aproximadamente de 5.000 a 10.000 personas en los Estados Unidos están aquejados de esta enfermedad [Grabowski, Adv. Hum. Genet. 21:377-441(1993)]. La enfermedad de Gaucher resultada de una deficiencia en glucocerebrosidasa (hGCD; glucosilceramidasa). Esta deficiencia conduce a una acumulación del sustrato de la enzima, glucocerebrósido, en células reticuloendoteliales de la médula ósea, bazo e hígado, produciendo complicaciones esqueléticas significativas tales como expansión de la médula ósea y deterioro óseo, y también hiperesplenismo, hepatomegalia, trombocitopenia, anemia y complicaciones pulmonares [Grabowski, (1993) véase arriba; Lee, Prog. Clin. Biol. Res. 95:177-217 (1982)].
55

La enzima lisosómica usada por el procedimiento es glucocerebrosidasa (GCD) de SEC ID N°: 8.

La proteína de la presente invención puede usarse para producir una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica incluye como principio activo de la misma dicha proteína como se define anteriormente y en las reivindicaciones y un vehículo farmacéutica aceptable. Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento, tal como una proteína recombinante, con otros componentes químicos tales como fármacos tradicionales, vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de una proteína o célula a un organismo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezcla, disolución, granulación, preparación de comprimidos recubiertos de azúcar, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

En una realización preferida, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal en la farmacopea europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. En lo sucesivo, los términos "vehículo fisiológicamente adecuado" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" se usan indistintamente y se refieren a un vehículo aprobado o un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no deroga la actividad biológica y propiedades del conjugado administrado.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua en un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína, preferible en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar más los procesos y la administración de los principios activos. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Otras técnicas para la formulación y administración de principios activos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, transdérmica, intestinal o parenteral, que incluyen inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, además de inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los principios activos de la invención pueden formularse en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para administración por vía oral, los principios activos pueden formularse opcionalmente por administración de las células completas que producen GCD humana de SEC ID N°: 8 según la presente invención. Los principios activos

también pueden formularse combinando los principios activos y/o las células con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los principios activos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Pueden prepararse preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes de disgregación tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel Carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de principio activo.

Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, además de cápsulas cerradas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración por vía oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

Para administración por vía oral, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para administración por inhalación, los principios activos para su uso se administran convenientemente en forma de una presentación de spray en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador usando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del principio activo y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los principios activos descritos en el presente documento pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con opcionalmente un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente pueden prepararse suspensiones de los principios activos como suspensiones para inyección aceitosa apropiada. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

En una realización, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones farmacéuticas para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Generalmente, los componentes se suministran tanto por separado como mezcladas juntas en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Si la composición va a administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Si la composición se administra por inyección puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente

aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellos derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como aquellos derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

5 Los principios activos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

10 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o de fase de gel adecuados. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

15 La vía tópica se realiza opcionalmente, y está asistida por un vehículo tópico. El vehículo tópico es uno que es generalmente apto para la administración tópica del principio activo e incluye cualquiera de tales materiales conocidos en la técnica. El vehículo tópico está seleccionado de manera que se proporcione a la composición en la forma deseada, por ejemplo, como un vehículo líquido o no líquido, loción, crema, pasta, gel, polvo, pomada, disolvente, diluyente líquido, gotas y similares, y puede comprender un material de origen tanto que se produce naturalmente como sintético. Claramente es esencial que el vehículo seleccionado no afecte adversamente el agente activo u otros componentes de la formulación tópica, y que sea estable con respecto a todos los componentes de la formulación tópica. Ejemplos de vehículos tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares. Formulaciones preferidas en el presente documento son pomadas inodoras incoloras, líquidos, lociones, cremas y geles.

20 Las pomadas son preparaciones semisólidas que normalmente se basan en petrolato u otros derivados del petróleo. La base de pomada específica que va a usarse, como será apreciado por aquellos expertos en la materia, es una que proporcionará la óptima administración de principios activos y, preferentemente, también proporcionará otras características deseadas, por ejemplo, emolencia o similares. Al igual que con otros excipientes o vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), en las páginas 1399-1404, las bases de pomada pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases en emulsión; y bases solubles en agua. Las bases de pomada oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de pomada emulsionables, también conocidas como bases de pomada absorbentes, contienen poco agua o no contienen agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y petrolato hidrófilo. Las bases de pomada en emulsión son tanto emulsiones de agua en aceite (W/O) como emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada solubles en agua preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable; de nuevo, puede hacerse referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy para más información.

25 Las lociones son preparaciones que van a aplicarse a la superficie de la piel sin fricción, y normalmente son preparaciones líquidas o semilíquidas en las que partículas sólidas, que incluyen el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son normalmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión aceitosa líquida del tipo aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas en el presente documento para tratar grandes áreas del cuerpo debido a la facilidad de aplicar una composición más fluida. Generalmente es necesario que la materia insoluble en una loción esté finamente dividida. Las lociones contendrán normalmente agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, además de principios activos útiles para la localización y la adhesión del agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o similares.

30 Las cremas que contienen los principios activos seleccionados son, como se conoce en la técnica, emulsiones líquidas o semisólidas viscosas, tanto aceite en agua como agua en aceite. Las bases de crema son lavables con agua y contienen una fase de aceite, un emulsionante y una fase acuosa. La fase aceitosa, también llamada algunas veces la fase "interna", comprende generalmente petrolato y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa supera normalmente, aunque no necesariamente, la fase aceitosa en volumen y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación en crema, como se ha explicado en Remington, arriba, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

35 Se prefieren formulaciones en gel para la aplicación al cuero cabelludo. Como será apreciado por aquellos que trabajan en el campo de la formulación de principios activos tópicos, los geles son sistemas semisólidos tipo suspensión. Los geles de una única fase contienen macromoléculas orgánicas sustancialmente distribuidas uniformemente por todo el vehículo líquido, que es normalmente acuoso, pero que preferentemente también contienen un alcohol y opcionalmente un aceite.

En las formulaciones tópicas de la invención pueden incluirse diversos aditivos conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse disolventes para solubilizar ciertas sustancias de principios activos. Otros

aditivos opcionales incluyen potenciadores de la permeación de la piel, opacificantes, antioxidantes, gelificantes, espesantes, estabilizadores y similares.

5 Las composiciones tópicas también pueden administrarse a la piel usando parches tipo dérmicos o artículos convencionales en los que la composición de principios activos está contenida dentro de una estructura laminada que sirve de dispositivo de administración de fármaco para fijarse a la piel. En una estructura tal, la composición de principios activos está contenida en una capa, o "depósito", que se encuentra debajo de una capa de refuerzo superior. La estructura laminada puede contener un único depósito, o puede contener múltiples depósitos. En una realización, el depósito comprende una matriz polimérica de un material de adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante la administración de principios activos. Ejemplos de materiales de adhesivo de contacto para la piel adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenos, polisiloxanos, polliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos y similares. El adhesivo polimérico particular seleccionado dependerá de los principios activos particulares, vehículo, etc., es decir, el adhesivo debe ser compatible con todos los componentes de la composición que contiene los principios activos. Alternativamente, el depósito que contiene los principios activos y el adhesivo de contacto para la piel están presentes como capas separadas y distintas, encontrándose el adhesivo debajo del depósito que, en este caso, puede ser tanto una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente como puede ser un depósito de líquido o hidrogel, o puede tomar alguna otra forma.

10 La capa de refuerzo en estos laminados que sirve de superficie superior del dispositivo funciona como elemento estructural primario de la estructura laminada y provee al dispositivo de gran parte de su flexibilidad. El material seleccionado para el material de refuerzo debe seleccionarse de manera que sea sustancialmente impermeable a los principios activos y a cualquier otro componente de la composición que contiene los principios activos, previniéndose así la pérdida de cualquier componente por la superficie superior del dispositivo. La capa de refuerzo puede ser tanto oclusiva como no oclusiva, dependiendo de si se desea que la piel se hidrate durante la administración de principios activos. El refuerzo está hecho preferentemente de una lámina o película de un material elastómero preferentemente flexible. Ejemplos de polímeros que son adecuados para la capa de refuerzo incluyen polietileno, polipropileno y poliésteres.

15 Durante el almacenamiento y antes del uso, la estructura laminada incluye un revestimiento de liberación. Inmediatamente antes de uso, esta capa se elimina del dispositivo para exponer la superficie basal del mismo, tanto el depósito de principios activos como una capa de adhesivo de contacto separada, de manera que el sistema pueda fijarse a la piel. El revestimiento de liberación debe fabricarse a partir de un material impermeable a principios activos/vehículo.

20 Tales dispositivos pueden fabricarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, por colada de una mezcla fluida de adhesivo, principios activos y vehículo sobre la capa de refuerzo, seguido de laminación del revestimiento de liberación. Similarmente, la mezcla de adhesivo puede colarse sobre el revestimiento de liberación, seguido de laminación de la capa de refuerzo. Alternativamente, el depósito de principios activos puede prepararse en ausencia de principios activos o excipiente, y luego cargarse por "remojo" en una mezcla de principios activos/vehículo.

25 Al igual que con las formulaciones tópicas de la invención, la composición de principios activos contenida dentro de los depósitos de principios activos de este sistema laminado puede contener varios componentes. En algunos casos, los principios activos pueden administrarse "puros", es decir, en ausencia de líquido adicional. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los principios activos se disolverán, dispersarán o suspenderán en un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado, normalmente un disolvente o gel. Otros componentes que pueden estar presentes incluyen conservantes, estabilizadores, tensioactivo y similares.

30 Debe observarse que la proteína de la invención se administra preferentemente al paciente en necesidad en una cantidad eficaz. Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para lograr un resultado seleccionado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la composición de la invención puede seleccionarse para ser útil para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

35 Composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principio activo eficaz para presentar, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose.

40 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

45 Para cualquier principio activo usado en los procedimientos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de actividad en animales. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluye la CI_{50} como se ha determinado por ensayos de actividad.

50 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales experimentales, por ejemplo,

determinando la CI_{50} y la DL_{50} (dosis letal que causa la muerte en el 50% de los animales probados) para un principio activo objeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de actividad y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en humanos. Por ejemplo, pueden determinarse dosis terapéuticamente eficaces adecuadas para el tratamiento de trastornos genéticos a partir de los experimentos con modelos animales de estas enfermedades.

La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden ser elegida por el médico individual en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1).

La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que son suficientes para mantener los efectos de modulación, llamada la concentración mínima eficaz (CME). La CME variará para cada preparación, pero opcionalmente puede estimarse a partir de datos en animales completos.

Los intervalos de dosificación también pueden determinarse usando el valor de CME. Las preparaciones pueden administrarse opcionalmente usando una pauta que mantiene niveles en plasma por encima de la CME durante el 10-90% del tiempo, preferible entre el 30-90%, y lo más preferentemente el 50-90%.

Dependiendo de la gravedad y la sensibilidad de la afección que va a tratarse, la dosificación también puede ser una administración única de una composición de liberación lenta descrita antes en este documento, durando el curso del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la cura o se logre la disminución del estado de enfermedad.

Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o de plástico tal como un envase alveolado. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado de un letrero asociado al recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la preparación, uso o venta de productos farmacéuticos, letrero que refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Tal letrero, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Agencia estadounidense del medicamento para fármacos de venta con receta o de un prospecto autorizado. También pueden prepararse composiciones que comprenden un principio activo de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible, disponerse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Como se usa en el presente documento, el término "modular" incluye inhibir, ralentizar o invertir sustancialmente la progresión de una enfermedad, mejorando sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o afección, o previniendo sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad o afección. Por tanto, un "modulador" incluye un agente que puede modular una enfermedad o afección.

Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores en llevar a cabo aspectos de la presente invención. Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Procedimientos experimentales:

Vectores de plásmido

CE-T – Se construyó a partir del plásmido CE obtenido del Prof. Galili [patente de Estados Unidos 5.367.110, 22 de noviembre (1994)].

El plásmido CE se digirió con Sall.

El extremo cohesivo de Sall se hizo como usando el fragmento grande de ADN polimerasa I. Entonces, el plásmido se digirió con PstI y se ligó a un fragmento de ADN que codificaba la señal que elige RE como diana del gen de endoquitinasa básica [*Arabidopsis thaliana*] ATGAAGACTAATCTTTTCTCTTCTCATCTTTCA

CTTCTCCTATCATTATCCTCGGCCGAATTC, y la señal que elige diana vacuolar de la quitinasa A de tabaco: GATCTTTTAGTCGATACTATG se digirió con SmaI y PstI.

pGREENII – Se obtuvo del Dr. P. Mullineaux [Roger P. Hellens y col., (2000) Plant Mol. Bio. 42:819-832]. La expresión del vector pGREEN II está controlada por el promotor ^{35}S del virus del mosaico de la coliflor, el elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico el tabaco) y la secuencia del terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

ADNc

hGCD – Se obtuvo de la ATCC (nº de acceso 65696), GC-2.2 [GCS-2 kb; lambda-EZZ-gamma3 *Homo sapiens*] que contiene beta-glucosidasa ácida [glucocerebrosidasas]. Longitudes de los insertos (kb): 2,20; Tejido: célula WI-38 de fibroblastos.

5 Construcción de plásmido de expresión

El ADNc que codifica hGCD (número de clon de ATTC 65696) se amplificó usando los cebadores directo: 5' CAGAATTCGCCCGCCCCTGCA 3' e inverso: 5' CTCAGATCTTGCGCATGCCACA 3'. El producto de ADN purificado por PCR se digirió con las endonucleasas EcoRI y BglII (véanse las secuencias de reconocimiento subrayadas en los cebadores) y se ligó en un vector intermedio que tenía un casete de expresión E-T digerido con las mismas enzimas. El casete de expresión se cortó y se eluyó del vector intermedio y se ligó en el vector binario pGREENII usando las enzimas de restricción SmaI y XbaI, formando el vector de expresión final. La resistencia a kanamicina se confiere por el gen NPTII accionado por el promotor nos obtenido junto con el vector pGREEN (Fig. 1B). El casete de expresión resultante se presenta por la Fig. 1A.

El plásmido resultante se secuenció para garantizar la correcta fusión en marco de las señales usando los siguientes cebadores de secuenciación: promotor ³⁵S de 5': 5' CTCAGAAGACCAGAGGGC 3', y el terminador de 3': 5' CAAAGCGCCATCGTGC 3'.

Establecimiento de callo de zanahoria y cultivos en suspensión de células

Los inventores realizaron el establecimiento de callo de zanahoria y cultivos en suspensión de células como se ha descrito previamente por Torres K.C. (Tissue culture techniques for horticultural crops, pág. 111, 169).

20 Transformación de células de zanahoria y aislamiento de células transformadas

La transformación de células de zanahoria se realizó usando transformación con *Agrobacterium* por una adaptación de un procedimiento descrito previamente [Wurtele, E.S. y Bulka, K. Plant Sci. 61:253-262 (1989)]. Durante todo el procedimiento se usaron células que crecían en medio líquido en lugar de callos. Los tiempos de incubación y de crecimiento se adaptaron para la transformación de células en cultivo líquido. Brevemente, se transformaron *Agrobacteria* con el vector pGREEN II por electroporación [den Dulk-Ra, A. y Hooykaas, P.J. (1995) Methods Mol. Biol. 55:63-72] y luego se seleccionaron usando 30 mg/ml del antibiótico paromomicina. Las células de zanahoria se transformaron con *Agrobacteria* y se seleccionaron usando 60 mg/ml de los antibióticos paromomicina en medio líquido.

30 Cribado de células de zanahoria transformadas para el aislamiento de callos que expresan altos niveles de GCD

14 días tras la transformación, células de cultivo se sembraron sobre medios sólidos a dilución del 3% de hematocrito para la formación de callos de agrupaciones individuales de células. Cuando los callos individuales alcanzaron 1-2 cm de diámetro, las células se homogeneizaron en tampón de muestra SDS y los extractos de proteína resultantes se separaron sobre SDS-PAGE [Laemmli U., (1970) Nature 227:680-685] y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (nitrocelulosa Hybond C, 0,45 micrómetros. Nº de catálogo RPN203C de Amersham Life Science). La transferencia Western para la detección de GCD se realizó usando anticuerpos policlonales anti-hGCD (descritos en el presente documento más adelante). Los callos que expresaron niveles significativos de GCD se expandieron y se transfirieron para crecer en medios líquidos para el escalado, purificación de proteínas y análisis.

Preparación de anticuerpos policlonales

40 75 microgramos de GCD recombinante (Cerezyme™) se suspendieron en 3 ml de adyuvante completo de Freund y se inyectaron a cada uno de dos conejos. A cada conejo se le administró una inyección de refuerzo después de dos semanas. Los conejos se sangraron aproximadamente 10 días después de la inyección de refuerzo y de nuevo a intervalos de una semana hasta que empezó a disminuir el título de anticuerpos. Después de eliminarse del coágulo, el suero se dividió en alícuotas y se guardó a -20°C.

45 Escalado del crecimiento de cultivo en un biorreactor

Un callo de aproximadamente 1 cm (de diámetro) de células de zanahoria genéticamente modificadas que contenían el gen rh-GCD se sembró sobre placa de medio de agar de 9 cm de diámetro de Murashige y Skoog (MS) que contenía 4,4 g/l de medio MSD (Duchefa), 9,9 mg/l de HCl de tiamina (Duchefa), 0,5 mg de ácido fólico (Sigma), 0,5 mg/l de biotina (Duchefa), 0,8 g/l de hidrolizado de caseína (Ducifa), azúcar 30 g/l y hormonas 2-4 D (Sigma). El callo se cultivó durante 14 días a 25°C.

El cultivo celular en suspensión se preparó subcultivando el callo transformado en un medio líquido MSD (Murashige & Skoog (1962) que contenía 0,2 mg/l de ácido 2,4-dicloroacético), como es muy conocido en la técnica. Las células en suspensión se cultivaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (el volumen de trabajo empieza con 25 ml y después de 7 días aumenta a 50 ml) a 25°C con velocidad de agitación de 60 rpm. Posteriormente, el volumen de

cultivo celular se aumentó a Erlenmeyer de 1 l mediante la adición de volumen de trabajo hasta 300 ml bajo las mismas condiciones. El inóculo del biorreactor pequeño (10 l) [véase el documento WO98/13469] que contenía 4 l de medio MSD se obtuvo mediante la adición de 400 ml de células en suspensión derivadas de dos Erlenmeyer de 1 l que se cultivaron durante siete días. Después de una semana de cultivo a 25°C con 1 lpm de flujo de aire, el medio MDS se añadió hasta 10 l y el cultivo continuó bajo las mismas condiciones. Después de cinco días adicionales de cultivo, la mayoría de las células se cosecharon y se recogieron pasando el medio de células a través de una red de 80 µ. El medio adicional se presionó y la torta de concentrado de eritrocitos se guardó a -70°C.

Más detalles del dispositivo de biorreactor pueden encontrarse con respecto a la patente de EE.UU. nº 6.391.638 concedida el 21 de mayo de 2002.

10 **Purificación de proteínas**

Con el fin de separar el medio de GCD insoluble, la torta de células congeladas que contenía aproximadamente 100 g de células en peso húmedo se descongeló, seguido de centrifugación de las células descongeladas a 17000 x g durante 20 min a 4°C. Los materiales insolubles y las células intactas se lavaron por resuspensión en 100 ml de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM) y luego se precipitaron por centrifugación a 17000 g durante 20 min a 4°C. La rh-GCD (GCD recombinante humana) se extrajo y se solubilizó mediante homogeneización del sedimento en 200 ml de tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM, PMSF 1 mM, ácido ascórbico 20 mM, 3,8 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), DTT 1 mM y 1% de Triton-x-100). Entonces, el homogeneizado se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se clarificó por centrifugación a 17000 x g durante 20 min a 4°C. El sedimento se desechó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 5,5 mediante la adición de ácido cítrico concentrado. La turbidez generada después del ajuste del pH se clarificó por centrifugación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Se realizó purificación adicional por el procedimiento de columnas de cromatografía del siguiente modo: 200 ml de medio clarificado se cargaron sobre 20 ml de resina de intercambio catiónico fuerte (soporte Macro-Prep High-S, Bio-Rad) equilibrada en tampón citrato de sodio 25 mM a pH 5,5, empaquetado en una columna XK (2,6 x 20 cm). La columna se integró con un sistema AKTA-Prime (Amersham Pharmacia Biotech) que permitió monitorizar la conductividad, pH y absorbancia a 280 nm. La muestra se cargó a 20 ml/min, después la columna se lavó con tampón de equilibrio (tampón citrato de sodio 25 mM a pH 5,5) a la velocidad de flujo de 12 ml/min hasta que la absorbancia UV alcanzó la línea base. La pre-elución de la rh-GCD se realizó con tampón de equilibrio que contenía NaCl 200 mM y la elución se obtuvo con tampón de equilibrio que contenía NaCl 600 mM. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática y se agruparon los tubos que presentaron actividad enzimática (en el pico de elución). Las muestras agrupadas se diluyeron (1:5) en agua que contenía 5% de etanol y el pH se ajustó a 6,0 con NaOH. La muestra que contenía la rh-GCD se aplicó sobre la segunda columna de XK (1,6 x 20cm) empaquetada con 10 ml de la misma resina que en la columna previa. La resina en esta columna se equilibró con tampón citrato 20 mM a pH 6,0 que contenía 5% de etanol. Tras la carga de la muestra, la columna se lavó con el tampón de equilibrio y la GCD se eluyó de la columna por tampón de elución (tampón citrato 20 mM a pH 6,0, 5% de etanol y NaCl 1 M). Las fracciones del pico de absorbente en la etapa de elución se reunieron y se aplicaron sobre una tercera columna.

La etapa de purificación final se realizó sobre una columna XK (1,6 x 20 cm) empaquetada con 8 ml de resina de interacción hidrófoba (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, Tosoh Corp.). La resina se equilibró en tampón citrato 10 mM a pH 6,0 que contenía 5% de etanol. El conjunto de elución de GCD de la columna previa se cargó a 6 ml/min seguido de lavado con tampón de equilibrio hasta que el absorbente de UV alcanzó la línea base. La GCD pura se eluyó por tampón crítico 10 mM que contenía 50% de etanol, se recogió y se guardó a -20°C.

Determinación de la concentración de proteína

Las concentraciones de proteína en extractos y fracciones de células se ensayaron mediante el procedimiento de Lowry/Bradford (ensayo de proteínas de Bio Rad) [Bradford, M., Anal. Biochem. (1976) 72:248] usando un patrón de albúmina de suero bovino (fracción V Sigma). Alternativamente, la concentración de muestras de proteínas homogéneas se determinó por absorción a 280 nm, $1 \text{ mg/ml} = 1,4 \text{ D.O.}_{280}$. La pureza se determinó por la relación 280/260 nm.

Ensayo de actividad enzimática de GCD

La actividad enzimática de GCD se determinó usando p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (Sigma) como sustrato. El tampón de ensayo contuvo tampón fosfato-citrato 60 mM a pH=6, β-mercaptoetanol 4 mM, EDTA 1,3 mM, 0,15% de Triton X-100, 0,125% de taurocolato de sodio. El ensayo se realizó en placa de ELISA de 96 pocillos, 0-50 microlitros de muestra se incubaron con 250 microlitros de tampón de ensayo y se añadió sustrato a la concentración final de 4 mM. La reacción se incubó a 37°C durante 60 min. La formación de producto (p-nitrofenilo; pNP) se detectó por absorbancia a 405 nm. La absorbancia a 405 nm se monitorizó a t=0 y en el punto final. Después de 60 min se añadieron 6 microlitros de NaOH 5 N a cada pocillo y de nuevo se monitorizó la absorbancia a 405 nm. La curva patrón de referencia ensayada en paralelo se usó para cuantificar concentraciones de GCD en las muestras probadas [Friedman y col., (1999) Blood, 93(9):2807-16].

Análisis bioquímicos:**Análisis de proteólisis en gel y espectrometría de masas**

Las bandas de proteínas teñidas en el gel se cortaron con una hoja de afeitar limpia y las proteínas en el gel se redujeron con DTT 10 mM y se modificaron con yodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 10 mM. Los trozos de gel se trataron con 50% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 10 mM para eliminar la tinción de las proteínas tras el secado de los trozos de gel. Los trozos de gel secados se rehidrataron con 10% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 10 mM que contenía aproximadamente 0,1 µg de tripsina por muestra. Los trozos de gel se incubaron durante la noche a 37°C y los péptidos resultantes se recuperaron con 60% de acetonitrilo con 0,1% de trifluoroacetato.

Los péptidos tripticos se resolvieron por cromatografía de fase inversa sobre capilares de sílice fusionados de 0,1 X 300 mm (J&W, DI de 100 micrómetros) rellenos en casa con R2 porosa (Persepective). Los péptidos se eluyeron usando un gradiente lineal de 80 min del 5 al 95% de acetonitrilo con 0,1% de ácido acético en agua a la velocidad de flujo de aproximadamente 1 µl/min. El líquido de la columna se electropulverizó en un espectrómetro de masas de trampa de iones (LCQ, Finnegan, San Jose, CA). La espectrometría de masas se realizó en el modo de ión positivo usando repetitivamente barrido de EM completo seguido de disociación inducida por colisión (DIC) del ión más dominante seleccionado del primer barrido de EM. Los datos de espectrometría de masas se compararon con la proteólisis simulada y la CID de las proteínas en la base de datos NR-NCBI usando el software Sequest [J. Eng y J. Yates, Universidad de Washington y Finnegan, San Jose].

El extremo amino de la proteína se secuenció sobre el secuenciador de péptidos 494A (Perkin Elmer) según instrucciones del fabricante.

Captación de GCD de macrófagos peritoneales

Se sabe que la elección como diana y la captación de GCD por macrófagos está mediada por el receptor de manosa/N-acetilglucosamina y puede determinarse usando macrófagos peritoneales provocados por tioglicolato obtenidos de ratones, como se describe por Stahl P. y Gordon S. [J. Cell Biol. (1982) 93(1):49-56]. Brevemente, ratones (hembra, cepa C57-B6) se inyectaron intraperitonealmente con 2,5 ml de 2,4% de medio bacto-tioglicolato sin dextrosa (nº de cat. de Difco 0363-17-2). Después de 4-5 días, los ratones tratados se sacrificaron por dislocación cervical y la cavidad peritoneal se aclaró con solución salina tamponada con fosfato. La células se sedimentaron por centrifugación (1000 x g 10 min) y se resuspendieron en DMEM (Beit Haemek, Israel) que contenía 10% de suero bovino fetal. Entonces, las células se sembraron a $1-2 \times 10^5$ célula/pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se incubaron a 37°C. Después de 90 minutos, las células no adherentes se lavaron tres veces usando PBS y los macrófagos adherentes se incubaron durante 90 min a 37°C en medio de cultivo que contenía cantidades especificadas de rhGCD que oscilaban de 0 a 40 microgramos en 200 microlitros de volumen final, en ausencia y presencia de manano de levadura (2-10, 5 mg/ml). Después de la incubación, el medio que contenía rGCD en exceso se eliminó y las células se lavaron tres veces con PBS y luego se lisaron con tampón de lisis (Tris 10 mM a pH=7,3, MgCl₂ 1 mM, 0,5% de NP-40 e inhibidores de proteasas). La actividad de rGCD recogida por las células se determinó sometiendo los lisados celulares a ensayo de glucosidasa *in vitro* como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 1**Construcción de plásmido de expresión**

Este ejemplo describe la construcción de un plásmido de expresión a modo de ejemplo usado con respecto a los ejemplos dados más adelante, en más detalle.

El ADNc que codifica hGCD (número de clon de ATTC 65696) se amplificó usando los cebadores directo: 5' CAGAATTCGCCCGCCCTGCA 3' (también denotada por SEC ID Nº: 1) e inverso: 5' CTCAGATCTTGCGATGCCACA 3' (también denotada por SEC ID Nº: 2).

El producto de ADN purificado por PCR se digirió con las endonucleasas EcoRI y BglII (véanse las secuencias de reconocimiento subrayadas en los cebadores) y se ligaron en un vector intermedio que tenía un casete de expresión CE-T digerido con las mismas enzimas. CE-T incluye la señal que elige RE como diana MKTNLFLFLIFSLLSLSSAEA (también denotada por SEC ID Nº: 3) del gen de endoquitinasa básico [*Arabidopsis thaliana*] y señal que elige diana vacuolar de la quitinasa A de tabaco: DLLVDTM* (también denotada por SEC ID Nº: 4).

El casete de expresión se cortó y se eluyó del vector intermedio y se ligó en el vector binario pGREENII usando las enzimas de restricción Smal y XbaI, formando el vector de expresión final. La resistencia a kanamicina se confiere por el gen NPTII accionado por el promotor nos junto con el vector pGREEN (Fig. 1B). El casete de expresión resultante se presenta por Fig. 1 A.

El plásmido resultante se secuenció para garantizar la correcta fusión en marco de las señales usando los siguientes

cebadores de secuenciación:

Cebador del promotor ³⁵S de 5': 5' CTCAGAAGACCAGAGGGC 3' (también denotada por SEC ID N°: 5) y el terminador de 3': 5' CAAAGCGGCCATCGTGC 3' (también denotada por SEC ID N°: 6). La secuencia codificante de hGCD clonada verificada se denota por SEC ID N°: 7.

5 Ejemplo 2

Transformación de células de zanahoria y cribado para células transformadas que expresan RHGCD

Este ejemplo describe un procedimiento a modo de ejemplo para transformar células de zanahoria según la presente invención, como se usa en los ejemplos más adelante.

10 La transformación de células de zanahoria se realizó por transformación con *Agrobacterium* como se ha descrito previamente por [Wurtele y Bulka (1989), véase arriba]. Células de zanahoria genéticamente modificadas se sembraron sobre medio agar Murashige y Skoog (MS) con antibióticos para la selección de transformantes. Como se muestra por la Fig. 2, los extractos preparados a partir de callos que se produjeron se probaron para la expresión de GCD por análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-hGCD, y se compararon con el patrón Cerezyme (control positivo) y extractos de células no transformadas (control negativo). De los diversos callos
15 probados, un callo (número 22) se seleccionó para escalar el crecimiento y la purificación de proteínas.

La transferencia Western se realizó del siguiente modo.

Para este ensayo, proteínas de la muestra obtenida se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a nitrocelulosa. Para este fin, los geles de SDS-poliacrilamida se prepararon del siguiente modo. Los
20 geles de SDS consisten en un gel de apilamiento y un gel de resolución (según Laemmli, UK 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227, 680-685). La composición de los geles de resolución fue del siguiente modo: 12% de acrilamida (Bio-Rad), 4 microlitros de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina; número de catálogo de Sigma T9281) por 10 ml de disolución de gel, 0,1% de SDS, Tris-HCl 375 mM, pH 8,8 y persulfato de amonio (APS), 0,1%. Se usaron TEMED y persulfato de amonio en este contexto como iniciadores de radicales libres para la polimerización. Aproximadamente 20 minutos después de la iniciación
25 de la polimerización, el gel de apilamiento (3% de acrilamida, 0,1% de SDS, Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, 0,1% de APS y 5 microlitros de TEMED por 5 ml de disolución de gel de apilamiento) se vertió sobre el gel de resolución y se insertó un peine de 12 ó 18 espacios para crear los picillos para muestras.

Las cámaras de ánodo y cátodo se cargaron con disolución de tampón idéntica: tampón Tris-glicina que contenía SDS (Biorad, número de catálogo 161-0772), pH 8,3. El material que contenía antígeno se trató con 0,5 volúmenes
30 de tampón de carga de la muestra (30 ml de glicerol (número de catálogo de Sigma G9012), 9% de SDS, 15 ml mercaptoetanol (número de catálogo M6250), Tris-HCl 187,5 mM, pH 6,8, 500 microlitros de azul de bromofenol, todos los volúmenes por 100 ml de tampón de muestra), y la mezcla se calentó luego a 100°C durante 5 minutos y se cargó sobre el gel de apilamiento.

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, 45-60
35 minutos usando una intensidad de corriente constante de 50-70 voltios seguido de 45-60 min a 180-200 voltios para geles de 13 por 9 cm de tamaño. Entonces, los antígenos se transfirieron a nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, Dassel).

La transferencia de proteínas se realizó como se describe sustancialmente en el presente documento. El gel se dispuso, junto con la nitrocelulosa adyacente, entre papel de filtro Whatmann 3 MM, material espumado de 0,5 cm
40 de espesor conductor y electrodos de alambre que conducían la corriente a modo de electrodos de platino. El papel de filtro, el material espumado y la nitrocelulosa se empaparon minuciosamente con tampón de transferencia (tampón TG de Biorad, número de catálogo 161-0771, se diluyeron 10 veces con metanol y tampón acuoso (20% de metanol)). La transferencia se realizó a 100 voltios durante 90 minutos a 4°C.

Después de la transferencia, los sitios de unión libres sobre la nitrocelulosa se saturaron a 4°C durante la noche con
45 tampón de bloqueo que contenía 1% de leche en polvo (Dairy America) y 0,1% de Tween 20 (cat de Sigma P1379) diluido con tampón fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435). Las tiras de transferencia se incubaron con un anticuerpo (dilución, 1:6500 en tampón fosfato que contenía 1% de leche en polvo y 0,1% de Tween 20 como antes, pH 7,5) a 37 °C durante 1 hora.

Después de la incubación con el anticuerpo, la transferencia se lavó tres veces durante 10 minutos en cada caso
50 con PBS (tampón fosfato de sodio tamponado con fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435)). Entonces, las tiras de transferencia se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con un anticuerpo secundario adecuado (cabra anti-conejo (molécula completa) HRP (cat de Sigma nº A-4914)), dilución 1:3000 en tampón que contenía 1% de leche en polvo (Dairy America) y 0,1% de Tween 20 (cat de Sigma P1379) diluido con tampón fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435)). Después de haberse lavado varias veces con PBS, las tiras de transferencia
55 se tiñeron con reactivos reveladores ECL (Amersham RPN 2209).

Después de sumergir las transferencias en los reactivos ECL, las transferencias se expusieron a película de rayos X FUJI Super RX 18x24 y se revelaron con revelador y fijador FUJI-ANATOMIX (nº de cat de FUJI-X fix FIXRTU 1 out of 2). Las bandas que mostraron las proteínas que se unieron por el anticuerpo fueron visibles después de este tratamiento.

5 **Escalado del crecimiento de cultivo en biorreactores**

Los cultivos en suspensión del callo 22 se obtuvieron subcultivando el callo transformado en un medio líquido. Las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer con agitación hasta que el volumen total fue suficiente para inocular el biorreactor (como se describe en Procedimientos experimentales). Las células de zanahoria transgénicas genéticamente modificadas pueden cultivarse durante meses, y la cosecha de células puede obtenerse en ciclos de 5 a 7 días (datos no mostrados). En el séptimo día de cultivo, cuando la cantidad de producción de rh-GCD en célula de zanahoria está en el pico, las células se recogieron pasando el cultivo a través de redes de 100 de malla. Debe observarse que las células pueden recogerse por medios conocidos en la técnica tales como filtración o centrifugación. La torta de concentrado de eritrocitos que proporciona el material para la purificación de h-GCD a homogeneidad puede almacenarse a la temperatura de congelación.

15 **Ejemplo 3**

Purificación de proteína hgcd activa recombinante de células de zanahoria transformadas

Se encontró que la h-GCD recombinante expresada en células de zanahoria transformadas se unía a membranas internas de las células y no se secretaba al medio. La rotura de células mecánicamente deja la rGCD unida a residuos de membrana insolubles (datos no mostrados). Entonces, la rGCD se disolvió usando detergentes suaves y se separó de residuos de células y otros componentes insolubles. La enzima soluble se purificó adicionalmente usando técnicas de cromatografía, que incluyen columnas de cromatografía de intercambio catiónico e interacción hidrófoba como se describe en Procedimientos experimentales.

Con el fin de separar el medio de la GCD insoluble, la torta de células congeladas que contenía aproximadamente 100 g de células en peso húmedo se descongeló, seguido de centrifugación a 17000 x g durante 20 min a 4°C. Los materiales insolubles y las células intactas se lavaron por resuspensión en 100 ml de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM) y se precipitaron por centrifugación a 17000 g durante 20 min a 4°C. La rGCD se extrajo y se solubilizó mediante homogeneización del sedimento en 200 ml de tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM, PMSF 1 mM, ácido ascórbico 20 mM, 3,8 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), DTT 1 mM, 1% de Triton-x-100 (Sigma)). El homogeneizado se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se clarificó por centrifugación a 17000 x g durante 20 min a 4°C. El sedimento se desechó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 5,5 mediante la adición de ácido cítrico concentrado. La turbidez generada después del ajuste del pH se clarificó por centrifugación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Se realizó purificación adicional por columnas de cromatografía del siguiente modo: en una primera etapa, 200 ml de extracto clarificado se cargaron sobre 20 ml de resina de intercambio catiónico fuerte (soporte Macro-Prep High-S, Bio-Rad) equilibrada en tampón citrato de sodio 25 mM a pH 5,5, empaquetado en una columna XK (2,6 x 20 cm). La columna se integró con un sistema AKTA-Prime (Amersham Pharmacia Biotech) que permitió monitorizar la conductividad, pH y absorbancia a 280 nm. La muestra se cargó a 20 ml/min, después la columna se lavó con tampón de equilibrio (tampón citrato de sodio 25 mM a pH 5,5) a la velocidad de flujo de 12 ml/min hasta que la absorbancia UV alcanzó la línea base. La pre-elución de la rh-GCD se realizó con tampón de equilibrio que contenía NaCl 200 mM y la elución se obtuvo con tampón de equilibrio que contenía NaCl 600 mM. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática y se agruparon los tubos que presentaron actividad enzimática (en el pico de elución). Las muestras agrupadas se diluyeron (1:5) en agua que contenía 5% de etanol y el pH se ajustó a 6,0 con NaOH.

La Fig. 3A representa una ejecución convencional de esta etapa de purificación. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática como se muestra por la Fig. 3B y la Fig. 3C muestra la tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas para actividad.

Las fracciones de elución que contenían la rGCD se aplicaron sobre una segunda columna XK (1,6 x 20 cm) empaquetada con 10 ml de la misma resina que en la columna previa, para una segunda etapa de purificación. La resina en esta columna se equilibró con tampón citrato 20 mM a pH 6,0 que contenía 5% de etanol. Tras la carga de la muestra, la columna se lavó con el tampón de equilibrio y la rGCD se eluyó de la columna por tampón de elución (tampón citrato 20 mM a pH 6,0, 5% de etanol y NaCl 1 M). La Fig. 3D representa una ejecución convencional de esta etapa de purificación. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática como se muestra por la Fig. 3E y la Fig. 3F muestra una tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas para actividad.

Las fracciones del pico de absorbente en la etapa de elución se reunieron y se aplicaron sobre una tercera columna, para una tercera etapa de purificación. La tercera etapa de purificación se realizó sobre una columna XK (1,6 x 20 cm) empaquetada con 8 ml de resina de interacción hidrófoba (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, Tosoh Corp.). La resina se equilibró en tampón citrato 10 mM a pH 6,0 que contenía 5% de etanol. El conjunto de elución de GCD de

la columna previa se cargó a 6 ml/min seguido de lavado con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia UV alcanzó la línea base. La GCD pura se eluyó por tampón cítrico 10 mM que contenía 50% de etanol, se recogió y se guardó a -20°C.

5 La Fig. 4A representa una ejecución convencional de esta etapa de purificación. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron por ensayo de actividad enzimática (Fig. 4B) y la Fig. 4C muestra la tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas para actividad.

En una purificación por lotes de células que se procesaron, la proteína rGCD se purificó a un nivel superior al 95%; si sólo se realizan la primera y la tercera etapa, la pureza se logra a un nivel de aproximadamente el 80% (resultados no mostrados).

10 **Análisis bioquímicos**

Para validar la identidad de rhGCD purificada se realizó un análisis de espectrometría de masas-espectrometría de masas (EM-EM). Los resultados obtenidos mostraron el 49% de cobertura de la secuencia de proteínas que coincidió con la secuencia de aminoácidos predicha, basándose en el ADN del casete de expresión, que incluye el péptido conductor y secuencias que eligen diana.

15 **Captación y actividad de hGCD recombinante en macrófagos peritoneales**

20 Para determinar si la rhGCD producida en zanahoria se ha glucosilado correctamente y puede experimentar captación por células diana y, por tanto, ser útil para el tratamiento de enfermedad de Gaucher, a continuación se ensayó la capacidad de la rhGCD para unirse a y ser captada por macrófagos. La elección como diana de rhGCD para macrófagos está mediada por el receptor de manosa/N-acetilglucosamina (Man/GlcNAc) y puede determinarse usando macrófagos peritoneales provocados por tioglicolato. Como se muestra por la Fig. 5, la rGCD experimenta captación por células a un alto nivel. La Figura 5A muestra la captación por células de rGCD según la presente invención con respecto a la concentración de manano.

La Figura 5A muestra la captación a niveles comparables con Cerezyme™ (esta preparación se preparó al 80% de pureza con sólo la primera y tercera etapas del procedimiento de purificación descrito anteriormente).

25 Las Figuras 5B y 5C muestran que la captación de rGCD es a un mayor nivel que la de Cerezyme™, ya que esta preparación se preparó a más del 95% de pureza con las tres etapas del procedimiento de purificación descrito anteriormente.

30 Con respecto a la Figura 5C, el porcentaje de actividad específica de la actividad total, inhibido por 4 mg/ml de manano, es claramente mayor para la GCD de la presente invención (rGCD o GCD recombinante humana) que para el producto actualmente disponible en el mercado del siguiente modo: GCD (mezcla 1 de CB, que es la rGCD de la presente invención) - 75% de Cerezyme - 65%.

Además, como se muestra por las figuras, la adición de manano inhibió claramente la unión de rGCD por las células. A concentración de 2 mg/ml de manano, la unión de rGCD se inhibió el 50%.

35 Estos resultados muestran que incluso sin remodelar las estructuras de glucano, la rhGCD expresada y purificada de células de zanahoria transformadas puede experimentar captación para elegir específicamente como diana células de macrófago mediante receptores de Man/GlcNAc. Además, esta rhGCD recombinante es enzimáticamente activa.

La Figura 5D muestra que la rhGCD también es reconocida por un anticuerpo anti-GCD en una transferencia Western; rGCD se refiere a la proteína según la presente invención, mientras que el patrón de GCD (mostrado a 5, 10 y 25 ng por carril) es GCD comercialmente comprada (Cerezyme®).

40 **Ejemplo 4**

Pruebas de toxicología

45 El material obtenido según el procedimiento de purificación anterior se probó según protocolos de prueba de toxicología convencionales (Guidance for Industry on Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) PT 1 (61 FR 43934, 26 de agosto de 1996) y por la modificación de CPMP/ICH/286/95 ICH M3(M) Non-clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals, 16 de noviembre de 2000).

50 Los ratones se inyectaron del siguiente modo. Una dosis inicial de 1,8 mg/kg (dosis clínica) fue seguida de dosis de 9 y 18 mg/kg. Los grupos de prueba incluyeron seis ratones (ICR CD-1; 3 machos y 3 hembras) para recibir rGCD (en un vehículo líquido que muestra tampón citrato 25 mM, NaCl 150 mM, 0,01% de Tween 80, 5% de etanol) según la presente invención y otros seis ratones para ser tratados con el vehículo solo como grupo de control. Entonces, los ratones se observaron durante 14 días y se sacrificaron. Ninguno de los ratones murió antes de la eutanasia programada. Ninguno de los ratones mostró ningún efecto significativo del tratamiento.

No se encontraron hallazgos y/o cambios patológicos macroscópicos en el peso corporal en cualquiera de los ratones.

Ejemplo 5

Análisis de glucosilación

5 Se realizó el análisis de estructuras de glucano presentes en rGCD producida como se describe con respecto a los ejemplos previos. Como se describe en mayor detalle más adelante, los resultados indican que la mayoría de los glucanos contienen residuos de manosa terminales, además de estructuras con alto contenido de manosa. Ventajosamente se encontró que este producto con alto contenido de manosa era biológicamente activo y, por tanto, no se necesitaron etapas adicionales para su activación.

10 Los siguientes procedimientos se usaron para determinar la estructura de glucosilación de la hGCD recombinante producida según los ejemplos dados anteriormente. Brevemente, los enlaces de monosacárido para tanto N- como O-glucanos se determinaron usando una estrategia de hidrólisis y de EM-CG. Este procedimiento estima el tipo de enlace de los hidratos de carbono con el péptido y la composición de monosacárido general de una glucoproteína. Basándose en el conocimiento previo y también en las relaciones entre diversos monosacáridos, este procedimiento
15 puede sugerir los tipos de glucanos en la glucoproteína. Esta información es importante para estimar las posibles estructuras de glucano presentes en la proteína.

Otro procedimiento mostró el análisis de oligosacáridos de la población de N-glucanos. Se realizaron EM-FAB y EM-MALDI-TOF tras la digestión de alícuotas de las muestras con tripsina y la péptido N-glucosidasa F (PNGasa F) y permetilación de los glucanos. Este procedimiento se usa para desprender y aislar hidratos de carbono N-ligados de la glucoproteína enzimáticamente digerida. Se determinan las masas de las poblaciones de glucano en la mezcla de glucanos aislados y sus masas se comparan con aquellas de estructuras conocidas de bases de datos y en vista del análisis de composición de monosacáridos. Las estructuras propuestas también se basan en los patrones de glucosilación del organismo fuente.

20 Otro procedimiento incluyó analizar la población de O-glucanos tras la eliminación reductora de los glucopéptidos trípticos y tratados con PNGasa F, desalación y permetilación. Los O-glucanos no son liberados por PNGasa F, por tanto, los glucanos que siguen unidos a péptidos son lo más probablemente glucanos O-ligados. Entonces, estos glucanos son liberados por eliminación reductora y se analiza su masa.

El análisis de la composición de monosacáridos (resumido más adelante) reveló una distribución característica de hexosas, hexosaminas y pentosas característica de la glucosilación de plantas. Las relaciones entre GlcNac y manosa sugieren que las estructuras N-ligadas características son la población de glucanos predominante.

30 El análisis de espectrometría de masas de los N-glucanos de hGCD producidos como se ha descrito anteriormente indica que la población de N-glucanos predominante tiene la composición de monosacáridos Pent.desoxiHex.Hex3.HexNAc2.

Materiales y procedimientos

35 El análisis se realizó usando una combinación de espectrometría de masas por cromatografía de gases (EM-CG), espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (EM-FAB) y extracción retardada-espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (ER-EM-MALDI-TOF).

40 Para el análisis de oligosacáridos, la población de N-glucanos se analizó por EM-FAB y ER-EM-MALDI-TOF tras la digestión de alícuotas de las muestras con tripsina y péptido N-glucosidasa F (PNGasa F) y permetilación de los glucanos. La población de O-glucanos se analizó tras la eliminación reductora de los glucopéptidos trípticos y tratados con PNGasa F, desalación y permetilación.

Los enlaces de monosacáridos para tanto N- como O-glucanos se determinaron usando una hidrólisis, derivatización y estrategia de EM-CG.

Descripción experimental

45 Muestra

Cuando se recibieron los viales de muestra se les dio números de muestra únicos del siguiente modo (Tabla 1):

Tabla 1

Producto	número de referencia
Glucocerebrosidasa. Cuatro tubos que contenían	62995
1 ml de muestra cada uno a un concentración establecida	62996
de 0,8 mg/ml en tampón citrato 25 mM a pH 6,0,	62997
0,01% de Tween 80	62998

Las muestras se guardaron entre -10 y -30°C hasta que se requirieron.

Química de proteínas

5 Diálisis de muestras intactas

Un vial (que contenía 1 ml de proteína a una concentración establecida de 0,8 mg/ml) se inyectó en un casete de diálisis Slide-A-Lyser (corte de peso molecular 10 kDa) y se dializó a 4°C durante un periodo de 24 horas contra agua, cambiándose el agua 3 veces. Tras la diálisis, la muestra se sacó del casete y se liofilizó.

Digestión con tripsina de las muestras intactas para el cribado de oligosacárido

- 10 La muestra liofilizada dializada se resuspendió en tampón bicarbonato de amonio 50 mM ajustado a pH 8,4 con 10% de amoniaco ac. y se digirió con tripsina tratada con TPCK durante 4 horas a 37°C según los SOP B001 y B003. La reacción se terminó disponiéndola en un bloque térmico a 95°C durante 2 minutos seguido de liofilización.

Química de hidratos de carbono

Digestión de la péptido N-glucosidasa A

- 15 Las mezclas de péptido/glucopéptido tripticamente escindidas de la muestra de glucoproteínas se trató con la enzima péptido N-glucosidasa A (PNGasa A) en tampón acetato de amonio, pH 5,5 a 37°C durante 15 horas. La reacción se detuvo por liofilización. Los productos resultantes se purificaron usando un cartucho C₁₈ Sep-Pak.

Eliminación reductora

- 20 La fracción de Sep-Pak que contenía posibles glucopéptidos O-ligados se disolvió en una disolución de 10 mg/ml de borohidruro de sodio en hidróxido sódico 0,05 M y se incubó a 45°C durante 16 horas. La reacción se terminó mediante la adición de ácido acético glacial.

Desalación del material reductoramente eliminado

La desalación usando perlas Dowex se realizó según el SOP B022. La muestra se cargó sobre la columna y se eluyó usando 4 ml de 5% de ácido acético ac. Se liofilizó la fracción recogida.

25 Permetilación de hidratos de carbono liberados

Los hidratos de carbono N-ligados que se eluyeron en la fracción Sep-Pak con 5% de ácido acético ac. y posibles glucanos O-ligados liberados por eliminación reductora se permitilaron usando el procedimiento de hidróxido sódico (NaOH)/yoduro de metilo (MeI) (SOP B018). Una parte de la mezcla de glucanos N-ligados permitilados se analizó por EM-FAB y EM-MALDI-TOF y el resto se sometió a análisis de enlaces.

30 Análisis de enlaces del hidrato de carbono N-ligado

Derivatización

- 35 Las mezclas de muestra de glucanos permitilados obtenidas tras la digestión triptica y con PNGasa A o eliminación reductora se hidrolizaron (TFA 2 M, 2 horas a 120°C) y se redujeron (borodeuteruro de sodio (NaBD₄) en NH₄OH 2 M, 2 horas a temperatura ambiente, SOP B025). El borato producido en la descomposición del borodeuteruro se eliminó por 3 adiciones de una mezcla de metanol en ácido acético glacial (90:10) seguido de liofilización. Entonces, las muestras se acetilaron usando anhídrido acético (1 hora a 100°C). Las muestras acetiladas se purificaron por extracción en cloroformo. Entonces, los acetatos de alditol parcialmente metilados se examinaron por espectrometría de masas/cromatografía de gases (EM/CG). También se ejecutaron mezclas patrón de acetatos de alditol parcialmente metilados y un blanco bajo las mismas condiciones.

40

Espectrometría de masas/cromatografía de gases (EM/CG)

Una alícuota (1 µl) de las muestras de hidratos de carbonos derivatizadas disuelta en hexano se analizó por EM/CG usando un espectrómetro de masas Perkin Elmer Turbomass Gold con un cromatógrafo de gases Autosystem XL y un sistema de datos Dell bajo las siguientes condiciones:

5 Cromatografía de gases

Columna: DB5
 Inyección: Sobre la columna
 Temperatura del inyector: 40°C
 Programa: 1 minuto a 40°C, luego 70°C/minuto hasta 100°C, mantenimiento a 100°C durante 1 minuto, luego 8°C/minuto hasta 290°C, finalmente mantenimiento a 290°C durante 5 minutos.
 Gas portador: Helio

Espectrometría de masas

Voltaje de ionización: 70 eV
 Modo de adquisición: barrido
 Intervalo de masa: 35-450 Dalton
 Resolución de EM: Unidad

Análisis de azúcares de glucocerebrosidasa intacta**Derivatización**

10 Una alícuota equivalente a 500 µg de glucocerebrosidasa se liofilizó con 10 µg de arabitol como patrón interno. Ésta se metanolizó luego durante la noche a 80°C y se secó bajo nitrógeno. Los monosacáridos liberados se re-N-acetilaron usando una disolución de metanol, piridina y anhídrido acético, se secaron de nuevo bajo nitrógeno y se convirtieron en sus derivados de trimetilsililo (TMS) según la SOP B023. Los derivados de TMS se redujeron en volumen bajo nitrógeno, se disolvieron en 2 ml de hexano y se sonicaron durante 3 minutos. Entonces se dejó que las muestras se equilibraran a 4°C durante la noche. En paralelo se prepararon un blanco que contenía 10 µg de
 15 arabitol y una mezcla de monosacáridos patrón que contenía 10 µg de cada uno de fucosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico y arabitol. Entonces, los derivados de TMS se examinaron por espectrometría de masas/cromatografía de gases (EM/CG).

Espectrometría de masas/cromatografía de gases (EM/CG)

20 Una alícuota (1 µl) de la muestra de hidratos de carbonos derivatizada disuelta en hexano se analizó por EM/CG usando un espectrómetro de masas Perkin Elmer Turbomass Gold con un cromatógrafo de gases Autosystem XL y un sistema de datos Dell bajo las siguientes condiciones:

Cromatografía de gases

Columna: DB5
 Inyección: Sobre la columna
 Temperatura del inyector: 40°C
 Programa: 1 minuto a 90°C, luego 25°C/minuto hasta 140°C, 5°C/minuto hasta 220°C, finalmente 10°C/minuto hasta 300°C y mantenimiento a 300°C durante 5 minutos.
 Gas portador: Helio

Espectrometría de masas

Voltaje de ionización: 70 eV
 Modo de adquisición: barrido
 Intervalo de masa: 50-620 Dalton
 Resolución de EM: Unidad

25 Extracción retardada-espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (ER-EM-MALDI-TOF) y espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (EM-FAB)

La espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó usando un espectrómetro de masas por desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado a extracción retardada (ER).

30 Los glucanos permetilados secados se redisolviaron en metanol:agua (80:20) y se analizaron usando una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Como calibradores externos se usaron bradiquinina, angiotensina y ACTH.

Los análisis de espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos de iones positivos se llevaron a cabo en el espectrómetro de masas M-Scan's VG AutoSpecE que operaba a $V_{ac} = 8$ kV durante 4500 de intervalo de masa a sensibilidad completa con una resolución de aproximadamente 2500. Se usó una pistola de ión cesio para generar espectros que operaban a 30 kV. Los espectros se registraron en un sistema de datos VAX 3100 M76 usando el software Opus.

Los glucanos permitilados secados se redisolviaron en metanol y se cargaron sobre una diana previamente embadurnada con 2-4 μ l de tioglicerol como matriz antes de la inserción en la fuente.

Resultados y discusión

Análisis de azúcares con TMS de glucocerebrosidasa

Cribado de oligosacáridos N-ligados

La glucoproteína intacta se sometió a diálisis, seguido de digestión con tripsina, y los productos liofilizados se digirieron usando PNGasa A y luego se purificaron usando C₁₈ Sep-Pak. La fracción de 5% de ácido acético ac. (que contenía oligosacáridos N-ligados) se permitiló y los espectros de masas de FAB se obtuvieron usando una parte del oligosacárido derivatizado en un intervalo de baja masa para los iones del fragmento y se obtuvieron espectros de masas de ER-MALDI-TOF usando una parte de los oligosacáridos derivatizados en un intervalo de alta masa para los iones moleculares.

Análisis de N-glucanos de glucocerebrosidasa

La Tabla 1 enumera los iones de fragmentos predominantes presentes en los espectros de FAB e iones moleculares presentes en los espectros de MALDI. La región de iones moleculares (mostrada en el Apéndice III) contiene una señal predominante a m/z 1505,8 (de acuerdo con un ión cuasimolecular $[M+Na]^+$ para una estructura que tiene la composición Pent.desoxiHex.Hex₃.HexNAC₂). También se detectó un intervalo de iones cuasimoleculares menos intensos de acuerdo con estructuras complejas y con alto contenido de manosa. Las estructuras con alto contenido de manosa detectadas oscilan en tamaño de Hex₅.HexNAC₂ a m/z 1579,8 a Hex₈.HexNAC₂ a m/z 2193,0. Las señales complejas se producen de N-glucanos menos exhaustivamente procesados tales como m/z 1331,7 (de acuerdo con un ión cuasimolecular $[M+Na]^+$ para una estructura que tiene la composición Pent.Hex₃.HexNAC₂) o de N-glucanos mayores, por ejemplo m/z 1751,0 (de acuerdo con un ión cuasimolecular $[M+Na]^+$ para una estructura que tiene la composición Pent.desoxiHex.Hex₃.HexNAC₃), m/z 2375,4 (de acuerdo con un ión cuasimolecular $[M+Na]^+$ para una estructura que tiene la composición Pent.desoxiHex₂.Hex₄.HexNAC₄) y m/z 2753,6 (de acuerdo con un ión cuasimolecular $[M+Na]^+$ para una estructura que tiene la composición Pent.desoxiHex₃.Hex₅.HexNAC₄).

El espectro de masas de FAB proporciona información referente a estructuras de antena por medio de iones de fragmentos en la región de baja masa del espectro (datos no mostrados). Se detectaron señales que identificaron hexosa (a m/z 219) y HexNAC (a m/z 260) como monosacáridos terminales no reductores en los N-glucanos.

Tabla 2: Masas observadas en los espectros permitilados de glucocerebrosidasa (número de referencia 62996) tras la digestión triptica y con la péptido N-glucosidasa A

Señales observadas (m/z)	Posible asignación
Baja masa	
219	Hex ⁺
228	HexNAC ⁺ (- metanol)
260	HexNAC ⁺
Alta masa	
1032,4	Pent.Hex ₃ .HexNAC ⁺
1171,5	Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1299,6	Eliminación de fucosa de m/z 1505,8
1331,6	Pent.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1345,6	desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1505,7	Pent.desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1579,8	Hex ₅ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1709,9	Pent.desoxiHex.Hex ₄ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1750,9	Pent.desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₃ OMe + Na ⁺

(continuación)

Señales observadas (m/z)	Posible asignación
1783,9	Hex ₆ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1989,0	Hex ₇ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1997,0	Pent.desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₄ OMe + Na ⁺
2027,0	No asignado
2099,0	No asignado
2130,0	Pent.desoxiHex ₂ .Hex ₄ .HexNAC ₃ OMe + Na ⁺
2193,1	Hex ₈ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
2375,2	Pent.desoxiHex ₂ .Hex ₄ .HexNAC ₄ OMe + Na ⁺
2753,4	Pent.desoxiHex ₃ .Hex ₅ .HexNAC ₄ OMe + Na ⁺

5 Todas las masas en la columna uno son monoisotópicas, a menos que se establezca de otro modo. Los números másicos pueden no relacionarse directamente con los datos brutos ya que el software frecuentemente asigna números másicos a picos de isótopos de ¹³C, particularmente para masas superiores a 1700 Da.

Análisis de enlaces de N-gucanos de glucocerebrosidasa

El análisis de enlaces se realizó en los hidratos de carbono N-ligados liberados tras la digestión con PNGasa A, purificación con Sep-Pak y permetilación.

10 Se obtuvo un cromatograma complejo con algunos picos de impurezas que se originaron a partir de los reactivos de derivatización. La comparación del tiempo de retención y los espectros con mezclas patrón permitieron asignaciones provisionales del azúcar que contenía los picos enumerados en la Tabla 3.

Tabla 3: Tiempos de retención de los monosacáridos diversamente ligados detectados como sus acetatos de alditol parcialmente metilados en el análisis de EM-CG de glucocerebrosidasa (número de referencia 62996) tras la digestión triptica y con la péptido N-glucosidasa A

Compuestos observados	Tiempo de retención (min) de glucocerebrosidasa (62996)
Xilosa terminal	10,41
Fucosa terminal	10,84
Manosa terminal	12,29 (principal)
Galactosa terminal	12,55
Manosa ligada en 2	13,40
Glucosa ligada en 4	13,58
Manosa ligada en 2,6	14,91
Manosa ligada en 3,6	15,08
Manosa ligada en 2,3,6	15,87
GlcNAc ligado en 4	16,73
GlcNAc ligado en 3,4	17,59

15

Cribado de oligosacáridos ligado en 4,3-O

La eliminación reductora se llevó a cabo en la fracción del 60% de 2-propanol (posible fracción de glucopéptidos O-ligados) de la purificación de Sep-Pak de glucocerebrosidasa tras las digestiones con tripsina y PNGasa A. La

muestra se desaló tras terminarse la reacción y, después de la eliminación del borato, se permitió. Se obtuvieron espectros de masas de FAB usando una parte del oligosacárido derivatizado en un intervalo de baja masa para los iones de fragmentos y se obtuvieron espectros de masas de ER-MALDI-TOF usando una parte de los oligosacáridos derivatizados en un intervalo de alta masa para iones moleculares. No se observaron señales de acuerdo con la presencia de glucanos O-ligados (datos no mostrados).

Análisis de enlaces de O-glucanos de glucocerebrosidasa

El análisis de enlaces se llevó a cabo en los productos de la eliminación reductora después de la permetilación. No se observaron señales de acuerdo con la presencia de glucanos O-ligados típicos (datos no mostrados).

La Figura 6 muestra algunas estructuras de glucanos a modo de ejemplo como una comparación entre GCD obtenida de células CHO (ovario de hámster chino), que son células de mamífero (Cerezyme™), y la GCD de la presente invención, de células de zanahoria. Como se muestra, se requiere la remodelación de estas estructuras para obtener residuos de manosa expuestos a Cerezyme™. A diferencia, tales residuos de manosa expuestos se obtienen directamente para la GCD obtenida de células vegetales según la presente invención, sin requerir manipulación adicional, por ejemplo, con glucosilasas.

La Figura 7 representa la estructura de glucanos principal encontrada en rGCD. La Figura 7 muestra estructuras propuestas de: a) la población de oligosacáridos predominante encontrada en hGC expresada en suspensión de células de zanahoria (1505,7 m/z); b) núcleo N-ligado típico; c) núcleo N-ligado vegetal fucosilado. Los glucanos N-ligados se acoplan a la proteína por asparagina y mediante el extremo reductor del residuo de GlcNac (GN) a la derecha de los diagramas. Patrones de N-glucosilación de plantas, los residuos de fucosa pueden ser parte de la estructura central, unida al primer GlcNac usando un enlace alfa(1-3)-glucosídico, mientras que las estructuras de mamífero normalmente usan el enlace alfa(1-6)-glucosídico.

Las Figuras 8A-8D muestran todas las posibles estructuras para los N-glucanos detectados en la proteína rGCD según la presente invención.

La estructura de glucanos dominante que se identificó es la estructura de glucanos central encontrada en la mayoría de las glucoproteínas vegetales de guisante, arroz, maíz y otras plantas comestibles. Esta estructura contiene un residuo de xilosa central, además de una alfa-(1,3)-fucosa central. El trabajo realizado por Bardor y col. (33) muestra que el 50% de los donantes de sangre no alérgico tienen anticuerpos específicos para la xilosa central en sus sueros y el 25% tiene anticuerpos específicos para la alfa-(1,3)-fucosa central. Sin embargo todavía tiene que estudiarse si tales anticuerpos podrían introducir limitaciones al uso de glucoproteínas biofarmacéuticas derivadas de las plantas.

Las poblaciones de glucanos secundarias de la hGCD producida como se ha descrito anteriormente fueron principalmente las estructuras con alto contenido de manosa Hex4HexNAc2 a Hex8HexNAc2. Entre las estructuras complejas se presentaron estructuras tales como Pent.desoxiHex2.Hex4.HexNAc3 y Pent.desoxiHex3.Hex5.HexNAc3. Pent.Hex3.HexNAc2 se detectó en proporciones más pequeñas.

Los monosacáridos terminales principales son hexosa (manosa o galactosa) y N-acetilhexosamina, que está de acuerdo con la presencia de estructuras con alto contenido de manosa y estructuras complejas parcialmente procesadas.

Con respecto al cribado de oligosacáridos O-ligados, no se observaron señales que estuvieran de acuerdo con glucanos O-ligados típicos. La GCD se conoce en la técnica por no tener oligosacáridos O-ligados, de forma que estos resultados están de acuerdo con la glucosilación conocida de GCD de otros sistemas de células, que incluye GCD nativa y GCD recombinante producida en sistemas de cultivo de mamífero. Sin embargo, en la composición de monosacáridos se detectaron señales de acuerdo con arabinosa.

Un punto importante es que la composición de N-glucanos de la proteína hGCD mostró que la mayoría de los N-glucanos terminan con residuos de manosa. Esto está de acuerdo con el requisito de que la manosa termine N-glucanos que ayudan en la captación de hGCD terapéutica por el macrófago receptor de manosa. Sin embargo, ni GCD nativa ni GCD recombinante producidas en células de mamífero tienen alto contenido de manosa. Por tanto, la presente invención vence un inconveniente significativo de las proteínas hGCD comercialmente producidas, que es que estas proteínas están modificadas para terminar con azúcares de manosa, a diferencia de la proteína producida como se ha descrito anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID Nº: 1

Secuencia de aminoácidos del péptido señal de RE:

MKTNLFLFLIFSLLLSLSSAEF

SEC ID Nº: 2

Secuencia de aminoácidos de la señal que elige diana vacuolar de la quitinasa A de tabaco:

DLLVDTM

SEC ID Nº: 3

Secuencia de ácidos nucleicos del cebador directo:

5 cagaattgcccccccctgca

SEC ID Nº: 4

Secuencia de ácidos nucleicos del cebador inverso:

ctcagatcttggcgatgccaca

SEC ID Nº: 5

10 Secuencia de ácidos nucleicos del cebador directo del promotor ³⁵S:

ctcagaagaccagaggct

SEC ID Nº: 6

Secuencia de ácidos nucleicos del cebador inverso del terminador:

caaagcggccatcgtgc

15 **SEC ID Nº: 7**

Secuencia de ácidos nucleicos de ADNc de GCD humana usado para las construcciones de la invención

gcccgccc ctgcatccct aaaagcttcg gctacagctc ggtgggtgtg

gtctgcaatg ccacatactg tgactccttt gacccccga cctttcctgc ccttgggtacc ttcagccgct
atgagagtac acgcagtggg cgacggatgg agctgagtat ggggcccatac caggctaatac acacgggcac
aggcctgcta ctgaccctgc agccagaaca gaagtccag aaagtgaagg gatttggagg ggccatgaca
gatgctgctg ctctcaacat ccttgccttg tcaccccctg cccaaaattt gctacttaa tctgacttct
ctgaagaagg aatcggatat aacatcatcc gggtacccat ggccagctgt gacttctcca tccgcaccta
cacctatgca gacaccctg atgatttcca gttgcacaac ttcagcctcc cagaggaaga taccaagctc
aagataccc tgattaccg agccctgcag ttggcccagc gtcccgttc actccttgc agcccctgga
catcaccac ttggctcaag accaatggag cggatgaatg gaaggggtca ctcaaggac agcccggaga
catctaccac cagacctggg ccagatactt tgtgaagttc ctggatgcct atgctgagca caagttacag
ttctgggcag tgacagctga aatgagcct tctgctgggc tgttgagtgg atacccttc cagtgcctgg
gcttcacccc tgaacatcag cgagacttca ttgcccgtga cctaggtcct accctcgcca acagtactca
ccacaatgct cgcctactca tgctggatga ccaacgcttg ctgctgcccc actgggcaaa ggtgggtactg
acagaccag aagcagctaa atatgttcat ggcatgtctg tacattggtg cctggacttt ctggctccag
ccaaagccac cctaggggag acacaccgcc tgttcccaa caccatgctc ttgctcag aggcctgtgt
gggctccaag ttctgggagc agagtgtgct gctaggctcc tgggatcgag ggatgcagta cagccacagc
atcatcacga acctcctgta ccatgtggtc ggctggaccg actggaacct tgccctgaac cccgaaggag
gaccaattg ggtgcgtaac tttgtcgaca gtccatcat ttagacatc accaaggaca cgttttaca
acagccatg ttctaccacc ttggccactt cagcaagttc attcctgagg gctcccagag agtggggctg
gttgccagtc agaagaacga cctggacgca gtggcactga tgcattccga tggctctgct gttgtgctg
tgctaaaccg ctctctaag gatgtgcctc ttaccatcaa ggatcctgct gtgggcttcc tggagacaat
ctcacctgct tactccattc acacctacct gtggcatcgc cag

SEC ID Nº: 8

Secuencia de aminoácidos de glucocerebrosidasa

A R P C I P K S F G Y S S V V
C V C N A T Y C D S F D P P T F P A L G T F S
R Y E S T R S G R R M E L S M G P I Q A N H T
G T G L L L T L Q P E Q K F Q K V K G F G G A
M T D A A A L N I L A L S P P A Q N L L L K S
Y F S E E G V R L L M L N D Q R L L L P H W A K V
V L T D P E A A K Y V H G I A V H W Y L D F L A P A K A
T L G E T H R L F P N T M L F A S E A C V G S K F W E
Q S V R L G S W D R G M Q Y S H S I I T N L L Y H V V
G W T D W N L A L N P E G G P N W V R N F V D S P I I
V D I T K D T F Y K Q P M F Y H L G H F S K F I P E G S
Q R V G L V A S Q K N D L D A V A L M H P D G S A V V
V V L N R S S K D V P L T I K D P A V G F L E T I S P G
Y S I H T Y L W H R Q

SEC ID Nº: 9

5 Secuencia de ácidos nucleicos del promotor^{35S}

Ttttcacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgccagctatctgtcacttcacg
aaaggacagtagaaaaggaaggtggctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttca
agatgcctctaccgacagtggtcccaaatggacccccaccacgaggaacatcgtggaaaaagaaga
cgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaat
cccactatccttcgcaagaccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggac

SEC ID Nº: 10

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido señal de RE

atgaagactaatcttttctcttctcatctttcactctc ctatcattatcctcgccgaattc

10 **SEC ID Nº: 11**

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia que elige vacuolar como diana

gatcttttagtcgatactatg

SEC ID Nº: 12

Secuencia de ácidos nucleicos del terminador

15 taatttcacatgatctgtttttgttattcccttgcaatgcagggcctagggctatgaAtaaagttaatgt
gtgaatgtgtgaatgtgtgattgtgacctgaagggatcacgactataatcgtttataataaacaagactttg
tcccacaaacccccccccngcaga

SEC ID Nº: 13

Secuencia de ácidos nucleicos del casete de expresión de la invención

ttttcaaaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgccagctatctgtcacttcatcg
 aaaggacagtagaaaaggaaggtggctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaggctatcgttca
 agatgcctctaccgacagtggtcccaaagatggacccccaccacgaggaacatcgtggaaaaagaaga
 cgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatactccactgacgtaagggatgacgcacaat
 cccactatccttcgcaagaccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacaggcttcttgag
 atccttcaacaattaccaacaacaacaacaacaacattacaattactatttacaattacagtcga
 gggatccaaggagatataacaatgaagactaatcttttcttcttctatctttcacttctcctatcattatcc

71

tcggccgaattcggccgcccctgcatccctaaaagcttcggctacagctcgggtggtgtgtctgcaatgcc
 acatactgtgactcctttgacccccgaccttctctgcccttggtaccttcagccgctatgagagtacacgca
 gtggcgacggatggagctgagtatggggccatccaggctaatacacacgggcacaggcctgctactgac
 cctgcagccagaacagaagttccagaaagtgaagggatttggaggggcatgacagatgctgctgctctc
 aacatccttgcctgtcacccttgcctcctgccccaaatttgcacttaaatcgtacttctctgaagaaggaatcgga
 tatacatcatccgggtacctatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacacctt
 gatgattccagttgcacaactcagcctcccagaggaagataccaagctcaagatacccctgattcaccg
 agccctgcagttggcccagcgtcccgttctactccttgcagcccctggacatcaccacttggctcaagac
 caatggagcggatgaatgggaaggggtcactcaaggacagcccggagacatctaccaccagacctgggc
 cagatactttgtgaagttcctggatgcctatgctgagcacaagttacagttctgggcagtgacagctgaaaa
 tgagccttctgctgggctgttgagtgataccccttccagtgctgggcttacccttgaacatcagcgagac
 ttattgccctgacctaggctcctaccctcgccaacagtaactcaccacaatgtccgcctactcatgctggatg
 accaacgcttctgctgccccactgggcaaaggtggtactgacagaccagaagcagctaaatatgttcat
 ggcattgctgtacattggtacctggacttctggctccagccaaagccaccctaggggagacacaccgct
 gttcccaaacaccatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagttctgggagcagagtgctcggcta
 ggctcctgggatcgagggatgacgtacagccacagcatcatcacgaacctcctgtacctgtggtcggctg
 gaccgactggaaccttgcctgaaccccgaaggaggacccaattgggtgcgtaacttctgcagactccca
 tcattgtagacatcaccaaggacacgttttacaacagcccattgttctaccaccttggccactcagcaagt
 tcattcctgagggctcccagagagtggggctgggtgcccagtcagaagaacgacctggacgcagtggcactg
 atgcatcccgatggctctgctgtgtgtgctgctaaaccgctcctctaaggatgtgctcttaccatcaagg
 atcctgctgtgggcttctggagacaatctcactggctactcattcacacctacctgtggcatcgccaag
 atcttttagtcgatactatgtaatttcatgatctgttttgtgtattcccttgcaatgcagggcctagggtatga
 Ataaagttaatgtgtgaatgtgtgaatgtgtgattgtgacctgaagggatcacgactataatcgtttataata
 acaaaagactttgtcccaaaaacccccccccngcaga

SEC ID N°: 14

Secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante de la invención

M K T N L F L F L I F S L L L S L S S A E F A R P C
 I P K S F G Y S S V V C V C N A T Y C D S F D P P T F P

A L G T F S R Y E S T R S G R R M E L S M G P I Q A N
 H T G T G L L L T L Q P E Q K F Q K V K G F G G A M T
 D A A A L N I L A L S P P A Q N L L L K S Y F S E E G I G
 Y N I I R V P M A S C D F S I R T Y T Y A D T P D D F Q
 L H N F S L P E E D T K L K I P L I H R A L Q L A Q R P
 V S L L A S P W T S P T W L K T N G A V N G K G S L K G
 Q P G D I Y H Q T W A R Y F V K F L D A Y A E H K L Q
 F W A V T A E N E P S A G L L S G Y P F Q C L G F T P E
 H Q R D F I A R D L G P T L A N S T H H N V R L L M L
 D D Q R L L L P H W A K V V L T D P E A A K Y V H G I
 A V H W Y L D F L A P A K A T L G E T H R L F P N T M
 L F A S E A C V G S K F W E Q S V R L G S W D R G M Q
 Y S H S I I T N L L Y H V V G W T D W N L A L N P E G G
 P N W V R N F V D S P I I V D I T K D T F Y K Q P M F Y
 H L G H F S K F I P E G S Q R V G L V A S Q K N D L D
 A V A L M H P D G S A V V V L N R S S K D V P L T I K
 D P A V G F L E T I S P G Y S I H T Y L W H R Q D L L V
 D T M

REFERENCIAS

1. Ma, J. K. C, Drake, P.M.W. y Christou, P. (2003) *Nature reviews* 4, 794-805
2. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M, Rayon, C, Fischette-Laine, A.C., Gomord, V, Faye, L. (1998) *Plant Mol Biol* 38, 31-48
3. Lee, R E. (1982) *Prog Clin Biol Res* 95, 177-217
4. Grabowski, G. (1993) *Adv Hum Genet.* 21, 377-441
5. Grabowski, G. A. y Hopkin, R. J. (2003) *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 4, 403-436
6. Sorge, J. W., C.Westwood, B., Beutler, E. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 7289-7293
7. Berg-Fussman, A., Grace, M., Ioannou, Y. y Grabowski, G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14861-14866
8. Grace, M., Grabowski, GA. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 168, 771-777
9. Grace, M., Newman, K., Scheinker, V., Berg-Fussman, A. y Grabowski, G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269,2283-2291
10. Barton, N. W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., et al. (1991) *N Engl J Med.* 324,1464-1470
11. Grabowski, G. A., Barton, N. W., Pastores, G., Dambrosia, J. M., Banerjee, T. K., McKee, M. A., Parker, C, Schiffmann, R., Hill, S.C. y Brady, R. O. (1995) *Ann Intern Med* 122, 33-39
12. Pastores, G. M., Sibille, A.R., Grabowski, G.A. (1993) *Blood* 82, 408-416.
13. Weinreb, N. J., Charrow, J, Andersson, H.C., Kaplan, P, Kolodny, E.H., Mistry, P, Pastores, G, Rosenbloom, B.E., Scott, C.R., Wappner, R.S., Zimran, A. (2002) *Am J Med.* 113, 112-119
14. Bijsterbosch, M. K., Donker, W, van de Bilt, H, van Weely, S, van Berkel, T.J., Aerts, JM. (1996) *Eur J Biochem* 237, 344-3 49
15. Friedman, B., Vaddi, K., Preston, C, Mahon, E., Cataldo, J. R. y McPherson, J. M. (1999) *Blood* 93,2807-2816
16. Furbish, F. S., Steer, C.J., Krett, N.L., Barranger, J.A. (1981) *Biochim Biophys Acta* 673, 425-434
17. Doebber, T., Wu, M., Bugianesi, R, Ponpipom, M., Furbish, F., Barranger, J., Brady, R y Shen, T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2193-2199
18. Dwek, R A., Butters, T.D., Piatt, F.M., Zitzmann, N. (2002) *Nature reviews* 1, 65-75
19. Neuhaus, J. M., Rogers, J.C. (1998) *Plant Mol Biol* 38,127-144
20. Vitale, A y Galili, G. (2001) *Plant Physiol.* 125,115-118
21. Hellens, R., Edwards, EA., Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux, P.M. (2000) *Plant Mol Biol* 42, 819-832
22. Wurtele, E. S., Bulka, K. (1989) *Plant Sci* 61, 253-262
23. den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P.J. (1995) *Methods Mol Biol.* 55, 63-72
24. Laemmli, U. K. (1970) *Nature reviews* 227, 680-685

25. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* 72, 248-254
26. Stahl, P. G. S. (1982) *J Cell Biol* 93, 49-56
27. Takasaki, S., Murray, G., Furbish, F., Brady, R., Barranger, J. y Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10112-10117
- 5 28. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C, Fitchette-Laine, A. C, Gomord, V. y Faye, L. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38, 31-48
29. Frigerio, L, Pastres, A., Prada, A. y Vitale, A. (2001) *Plant Cell* 13, 1109-1126
30. Frigerio, L, de Virgilio, M, Prada, A., Faoro, F. y Vitale, A. (1998) *Plant Cell* 10,1031-1042
31. Hadlington JL, D. J. (2000) *Curr Opin Plant Biol.* 3, 461-468.
- 10 32. Okamoto, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. y Minamikawa, T. (2003) *Plant Physiol.* 132, 1892-1900
33. Bardor, M., Faveeuw, C, Fitchette, A.-C, Gilbert, D., Galas, L, Trottein, F., Faye, L y Lerouge, P. (2003) *Glycobiology* 13, 427-434

REIVINDICACIONES

1. Una proteína glucocerebrosidasa humana que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID N°: 7, en la que dicha proteína glucocerebrosidasa humana está glucosilada y comprende al menos una manosa expuesta, al menos una fucosa que tiene un enlace alfa(1-3)-glucosídico y al menos una xilosa, y está ligada en su extremo C a un péptido señal que elige dianas vacuolares como se expone en SEC ID N°: 2.
2. La proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 1, en la que dicha proteína glucocerebrosidasa humana está ligada en su extremo N a un péptido señal de retículo endoplasmático.
3. La proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 2, en la que dicho péptido señal de retículo endoplasmático es como se expone en SEC ID N°: 1.
4. La proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 3 que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 14.
5. La proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 1, en la que dicha proteína glucocerebrosidasa es una proteína aislada.
6. Una composición farmacéutica que comprende la proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una célula vegetal que expresa la proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 1.
8. Una célula vegetal que expresa la proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 2.
9. La célula vegetal de la reivindicación 7, en la que dicha célula vegetal es una célula de zanahoria.
10. La célula vegetal de la reivindicación 8, en la que dicha célula vegetal es una célula de zanahoria.
11. La célula vegetal de la reivindicación 7 u 8, en la que la estructura de glucano principal de dicha proteína glucocerebrosidasa de dicha célula vegetal comprende manosa expuesta.
12. Una composición farmacéutica para administración por vía oral que comprende células vegetales de la reivindicación 7 u 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que dichas células vegetales son células de zanahoria.
14. Uso de la composición farmacéutica como se define por la reivindicación 12 ó 13 para el tratamiento de enfermedad de Gaucher por administración por vía oral.

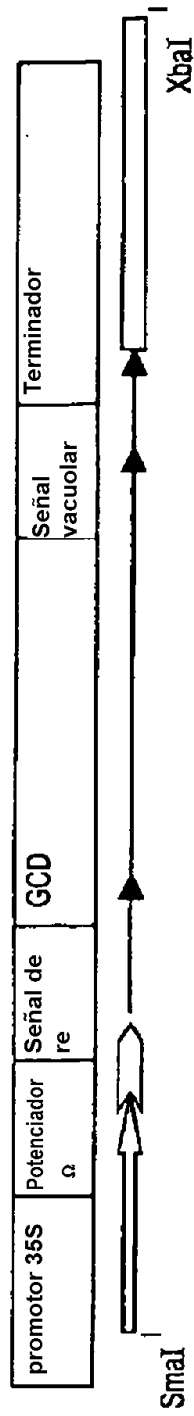


Fig. 1a

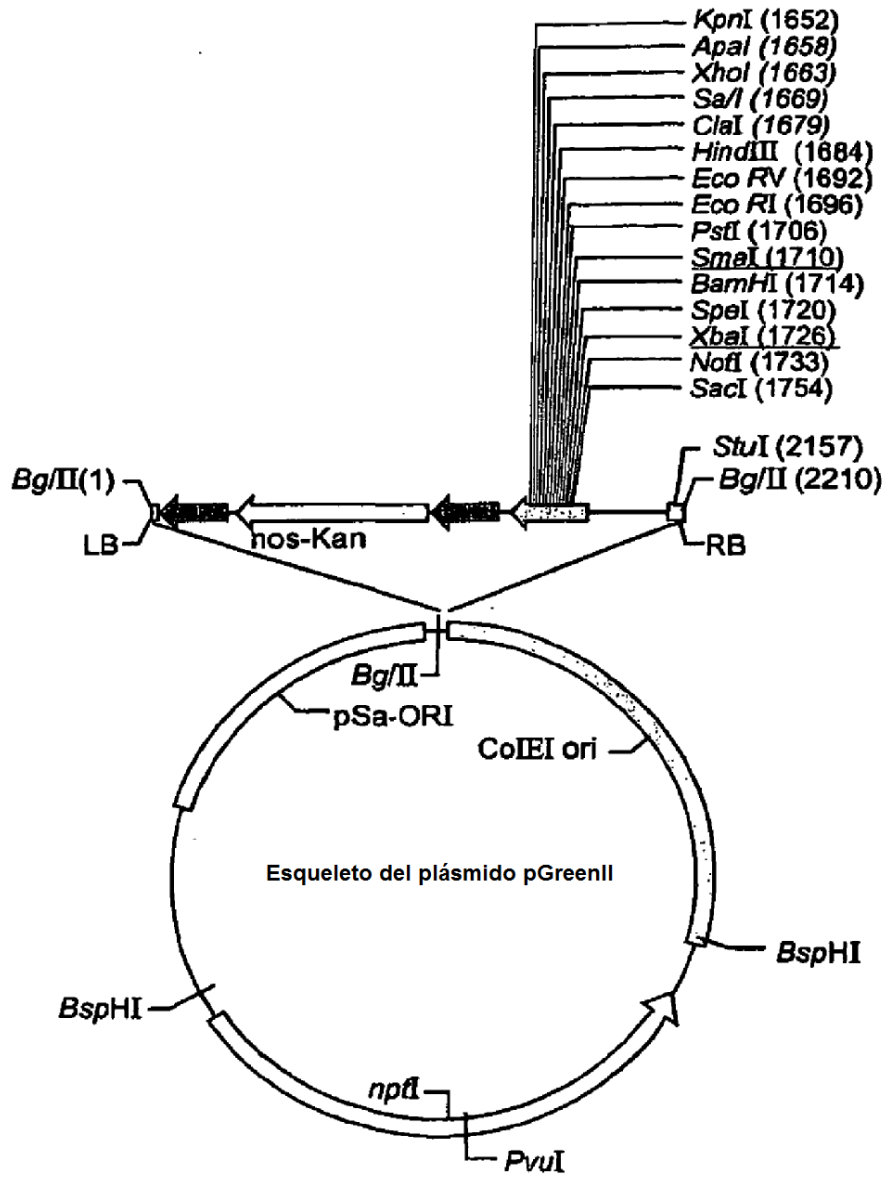


Fig. 1b

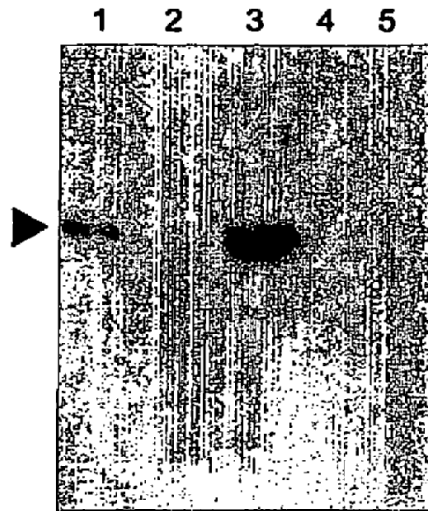


Fig. 2

Células transformadas expresan rGCD. Se homogeneizó 1 gramo de tejido de callo y se ejecutaron 15 microgramos de extracto de células solubles sobre SDS-PAGE. La expresión de rGCD en callos transformados seleccionados se probó por análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-hGCD específicos. 1: Cerezyme patrón, 2: extracto de callos sin transformar, 3-5: diversos extractos de callos transformados seleccionados.

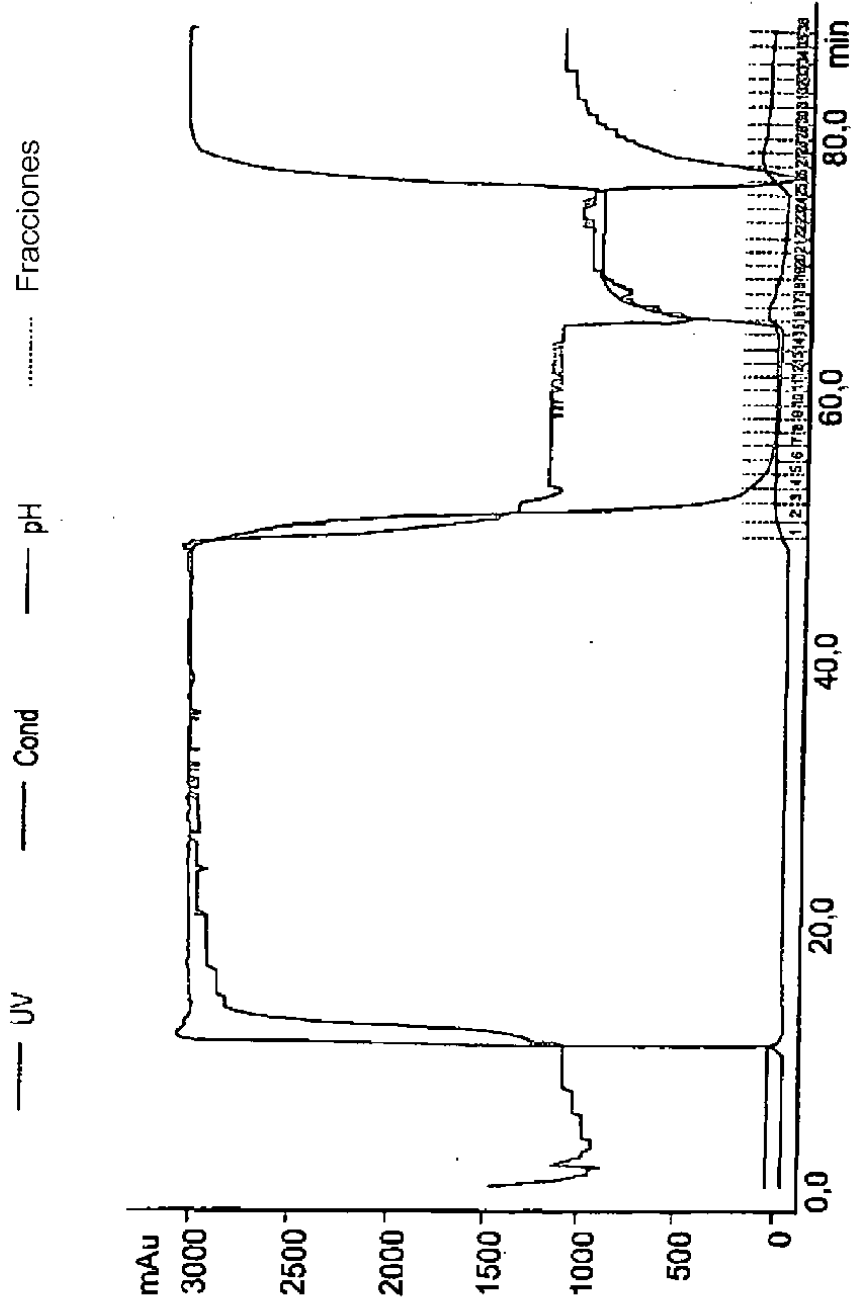


Fig. 3a

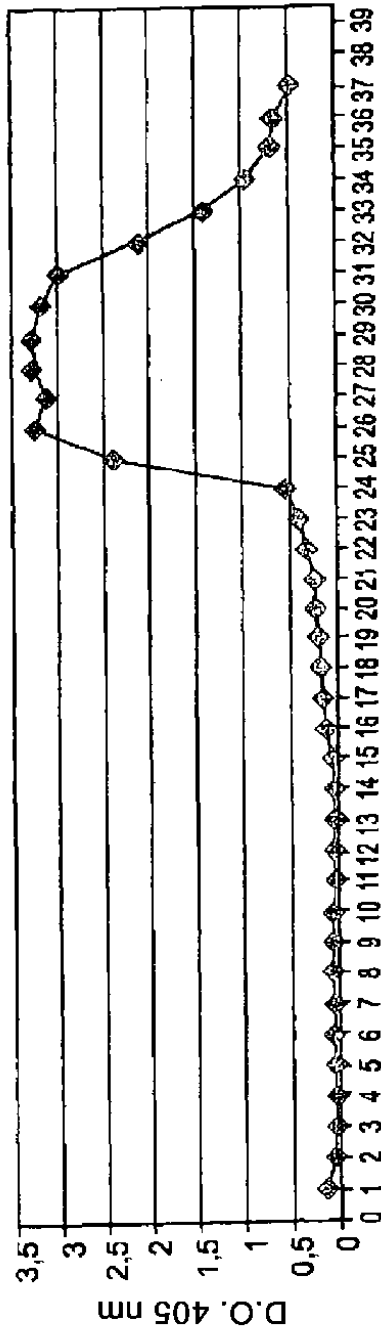


Fig. 3b

Fracción

FT 1 3 5 8 12 15 16 17 19 23 25 26 27 29 33 PM

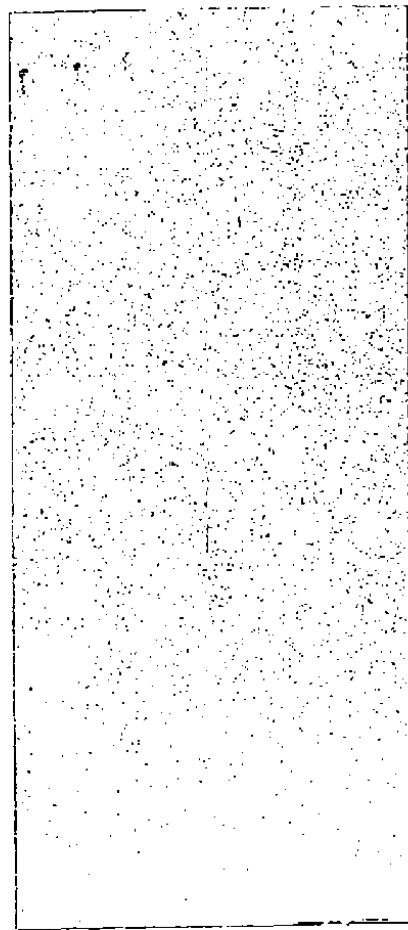


Fig. 3c

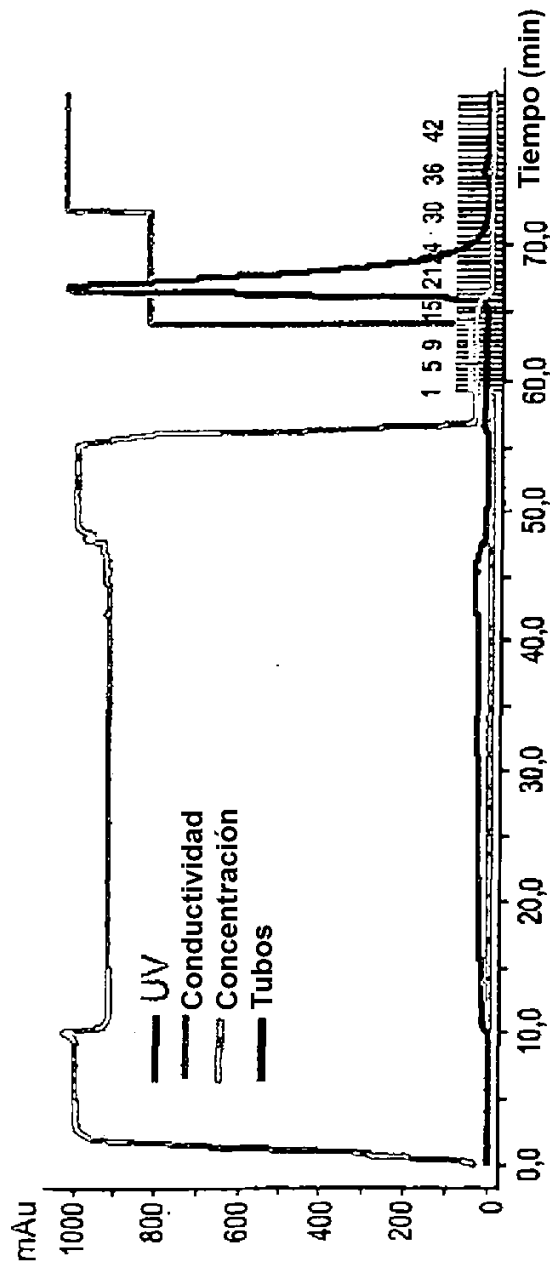


Fig. 3d

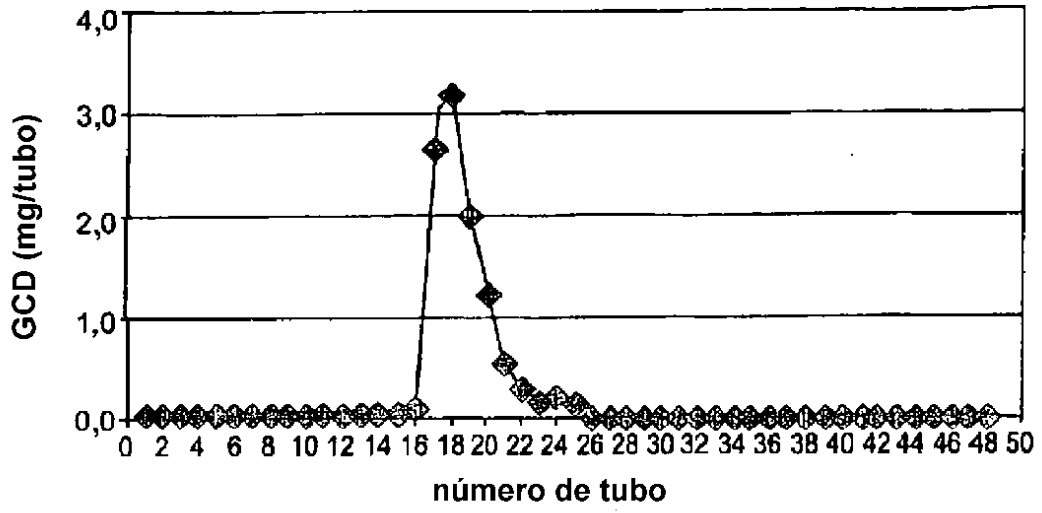


Fig. 3e

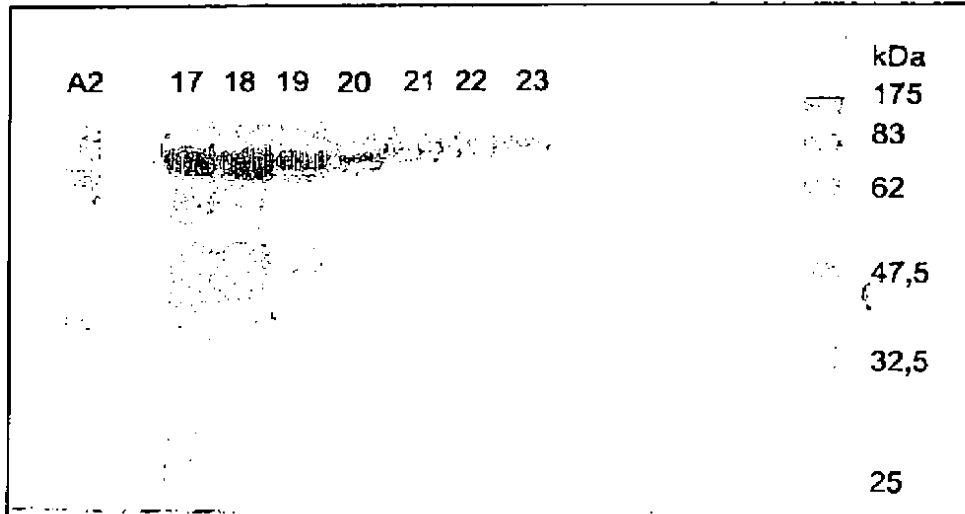


Fig. 3f

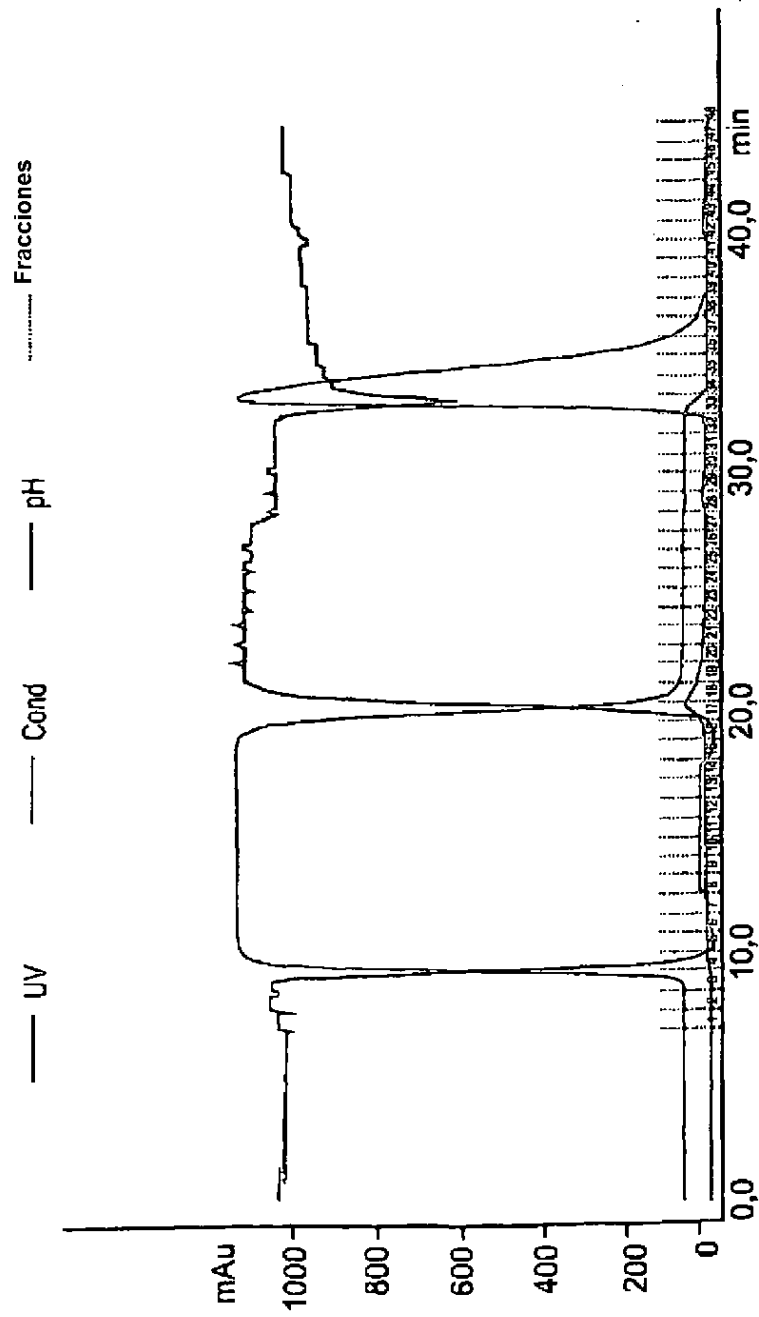
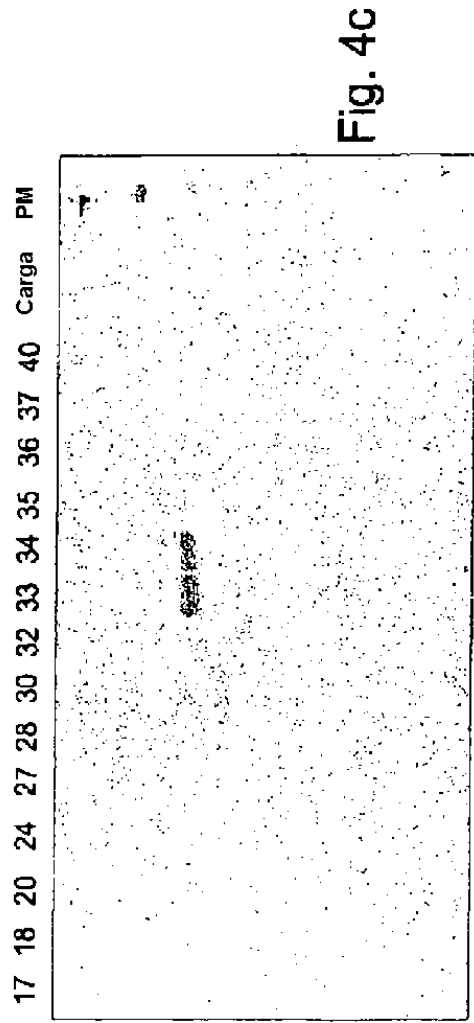
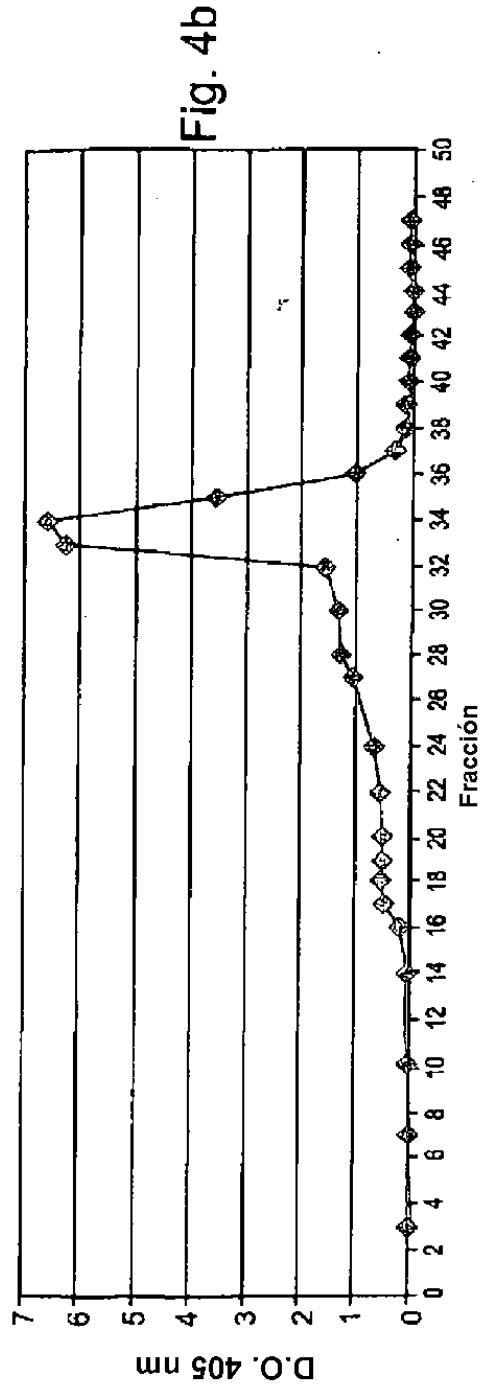


Fig. 4a



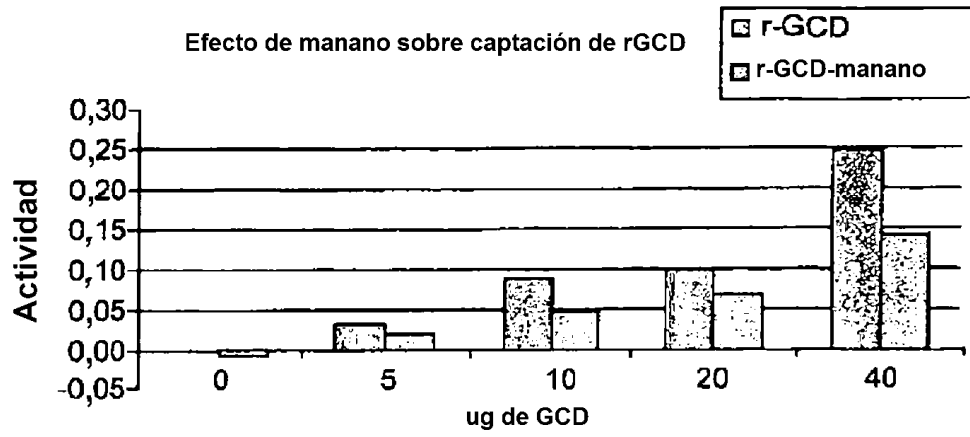


Fig. 5a

Captación de GCD en macrófagos peritoneales por receptores de manosa

GCD (mezcla 1 de CB = rGCD de la presente invención) frente a Cerezyme®

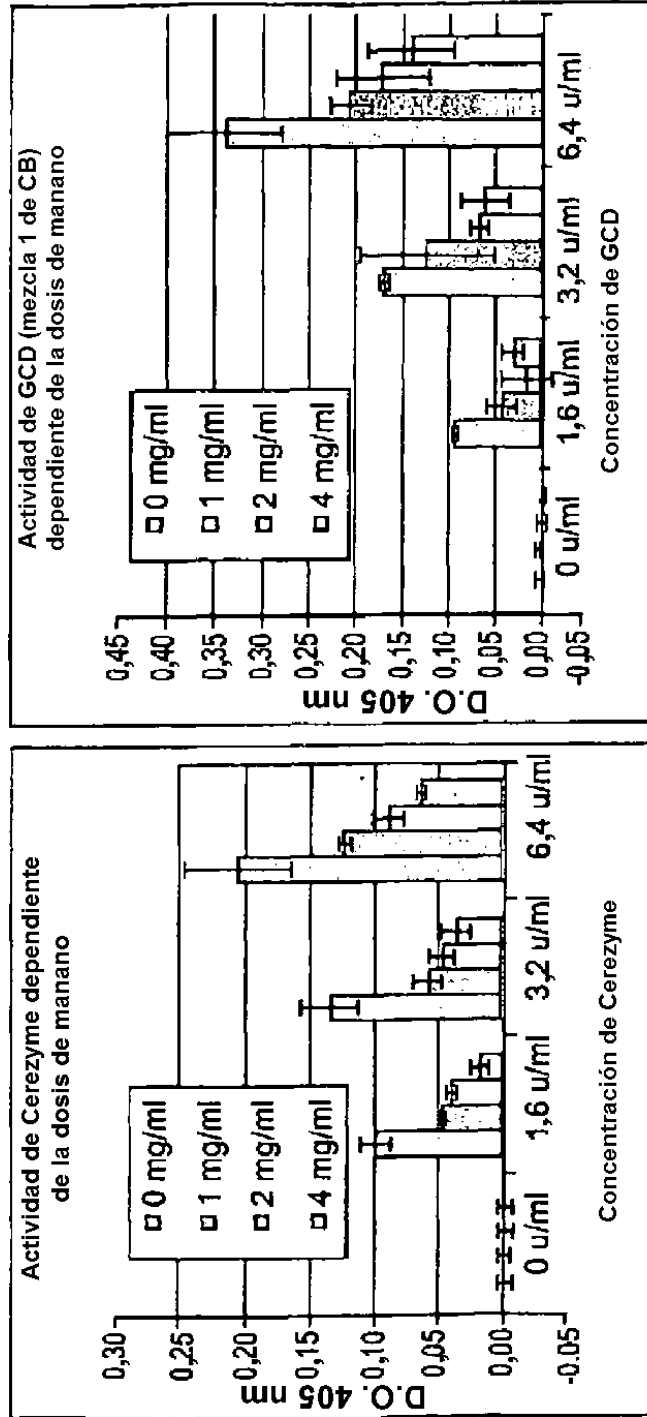


Fig. 5b

Captación de GCD en macrófagos peritoneales por receptores de manosa
 GCD (mezcla 1 de CB - rGCD de la presente invención) frente a Cerezyme®

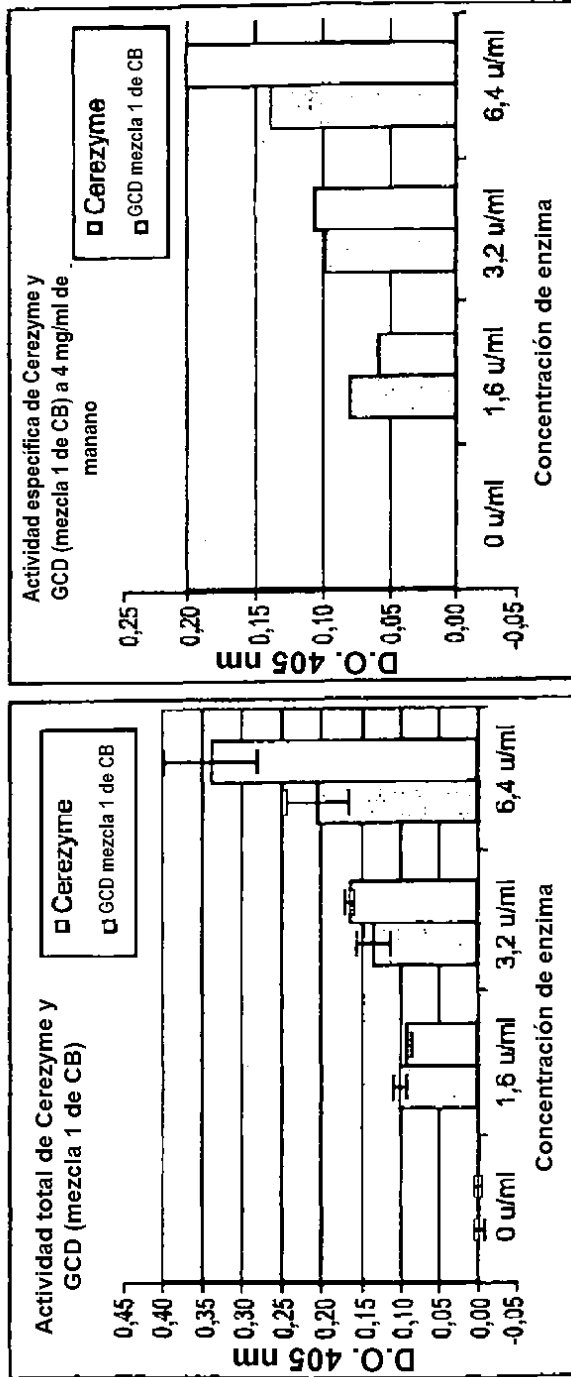


Fig. 5c

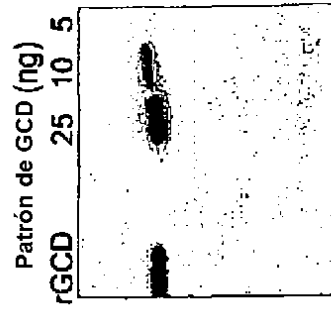
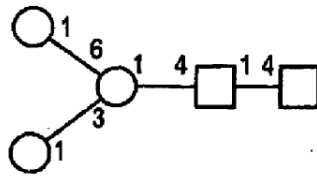
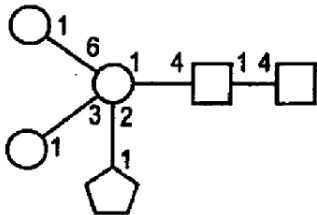


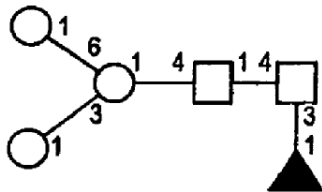
Fig. 5d



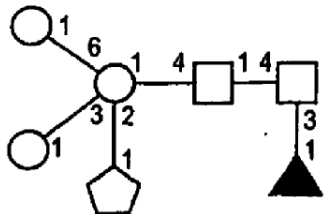
Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1171,5$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1331,6$

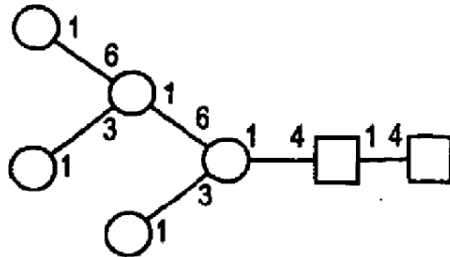


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1345,6$

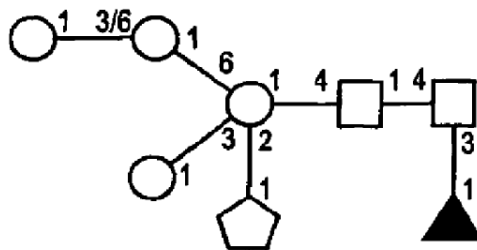


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1505,7$

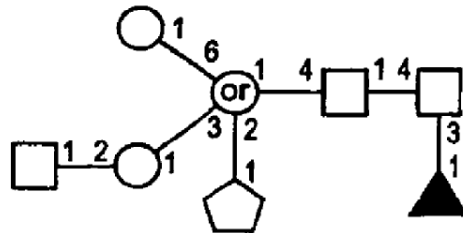
Fig. 8a



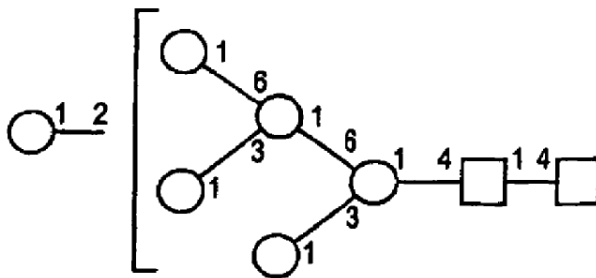
Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1579,8$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1709,7$

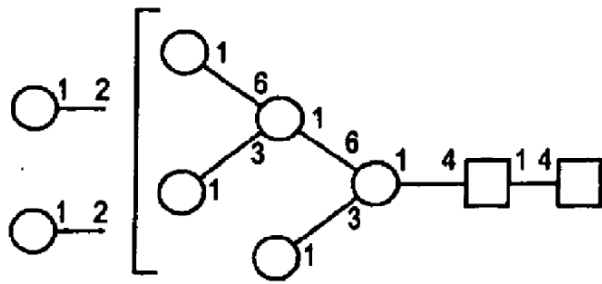


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1750,9$

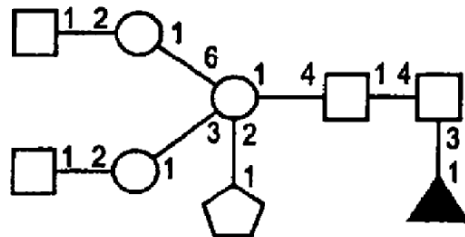


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1783,9$

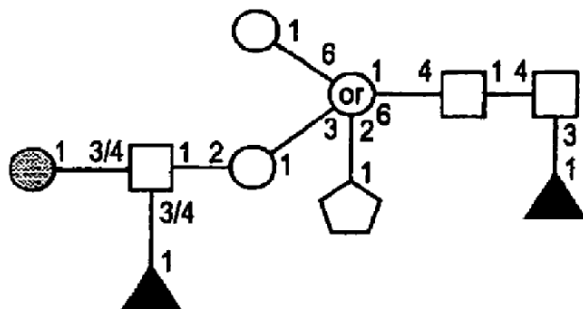
Fig. 8b



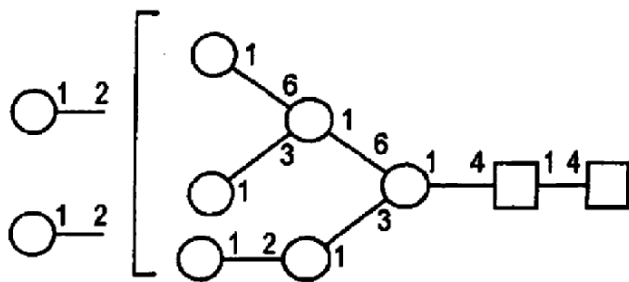
Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1989,0$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1997,0$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 2130,0$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 2193,1$

Fig. 8c

