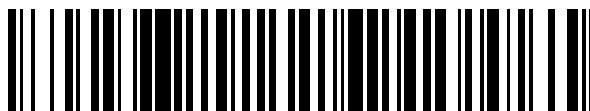


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 293**

51 Int. Cl.:

C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.1993 E 10157183 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2210947**

54 Título: **Método para producir proteínas secretadas**

30 Prioridad:

30.11.1992 US 983451

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

25.11.2013

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(100.0%)
One Gustave Levy Place
New York, NY 10029-6574, US**

72 Inventor/es:

**DESNICK, ROBERT J.;
BISHOP, DAVID F. y
IOANNOU, YIANNIS A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 293 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

Método para producir proteínas secretadas

1. Introducción

5 La presente invención se refiere a la producción de α -galactosidasa humana biológicamente activa (α -Gal A) que contiene manosa-6-fosfato, que supone la clonación y expresión de la secuencia de codificación genética para α -Gal A en un sistema de expresión de células CHO, el cual proporciona las adecuadas modificaciones posteriores a la traducción y el procesado del producto de expresión.

10 Se desvelan en la presente memoria ejemplos de trabajo en los que se produjeron niveles elevados de α -Gal A en sistemas de expresión en mamíferos. La enzima α -Gal producida de acuerdo con la invención se puede utilizar para varios fines, incluyendo, pero no estando limitados a, terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Fabry, procesos industriales que implican la hidrólisis de restos de α -D-galactosilo de glicoconjugados, y para la conversión del antígeno del grupo sanguíneo B en eritrocitos al antígeno del grupo sanguíneo O.

2. Antecedentes de la invención

15 A comienzos de los años 70, varios investigadores demostraron la existencia de dos isoenzimas de α -galactosidasa denominadas A y B, las cuales hidrolizaban los enlaces α -galactosídicos en 4-MU- y/o r-NP- α -D--galactopiranosidos (Kint, 1971, Arch. Int. Physiol. Biochem. 79: 633-644; Beutler & Kuhl, 1972, Amer. J. Hum. Genet. 24: 237-249; Romeo, *et al.*, 1972, FEBS Lett. 27: 161-166; Wood & Nadler, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 250-255; Ho, *et al.*, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24 : 256-266 ; Desnick, *et al.*, 1973, J. Lab. Clin. Med. 81: 157-171; y Desnick, *et al.*, 1989, en: The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver, C.R., Beaudet, A.L. Sly, W.S. and Valle, D., eds. pp. 1751-1796. McGraw Hill, New York). En tejidos, alrededor del 80-90% de la actividad de α -galactosidasa (α -Gal) total era debida a una isoenzima α -Gal A termolábil, que puede inhibirse por mioinositol, mientras que el resto lo justificaba una α -Gal B, relativamente termoestable. Las dos isoenzimas se podían separar por electroforesis, isoelectroenfoque y cromatografía de intercambio iónico. Después de un tratamiento con neuraminidasa, las migraciones electroforéticas y los valores del pI (punto isoeléctrico) de α -Gal A y B eran similares (Kint, 1971; Arch. Int. Physiol. Biochem. 79: 633-644), sugiriendo inicialmente que las dos enzimas eran los productos del mismo gen glicosilados de forma diferente. El hallazgo de que las enzimas glicoproteicas purificadas tenían similares propiedades físicas incluyendo el peso molecular de subunidad (\sim 46 kDa), estructuras homodiméricas y composiciones de aminoácidos, también indicaba su afinidad estructural (Beutler & Kuhl, 1972, J. Biol. Chem. 247: 7195-7200; Callahan *et al.*, 1973, Biochem. Med. 7: 424-431; Dean *et al.*, 1977, Biochem. Biophys. Res. Comm. 77: 1411-1417; Scram, *et al.*, 1977, Biochim. Biophys. Acta. 482: 138-144; Kusiak, *et al.*, 1978, J. Biol. Chem. 253: 184-190 ; Dean, *et al.*, 1979, J. Biol. Chem. 254: 10001-10005 ; and Bishop, *et al.*, 1980, en Enzyme Therapy in Genetic Disease: 2, Desnick, R.J. ed., pp. 17-32, Alan R. Liss, Inc., New York). Sin embargo, la demostración posterior de que los anticuerpos policlonales frente a α -Gal A o B no presentaban reacción cruzada con la otra enzima (Beutler & Kuhl, 1972, J. Biol. Chem. 247: 7195-7200; y Schram, *et al.*, 1977, Biochim. Biophys. Acta. 482: 138-144); de que solamente la actividad α -Gal A era deficiente en hemocigotos con enfermedad de Fabry (Kint, 1971, Arch. Int. Physiol. Biochem. 79: 633-644; Beutler & Kuhl, 1972, Amer. J. Hum. Genet. 24: 237-249; Romeo, *et al.*, 1972, FEBS Lett. 27: 161-166; Wood & Nadler, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 250-255; Ho, *et al.*, 1972, Am. J. Hum. Genet. 24: 256-266; Desnick, *et al.*, 1973, J. Lab. Clin. Med. 81: 157-171; y Desnick, *et al.*, 1989, en: The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver, C.R., Beaudet, A.L. Sly, W.S. and Valle, D., eds. pp. 1751-1796. McGraw Hill, New York; y (Beutler & Kuhl, 1972, J. Biol. Chem. 247 :7195-7200); y de que los genes para α -Gal A y B correspondían a diferentes cromosomas (Desnick, *et al.*, 1989, en: The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver, C.R., Beaudet, A.L. Sly, W.S. and Valle, D., eds. pp. 1751-1796, McGraw Hill, New York; deGroot, *et al.*, 1978, Hum. Genet. 44: 305-312), claramente demostraban que estas enzimas eran genéticamente distintas.

2.1. La α -Gal A y la enfermedad de Fabry

45 En la enfermedad de Fabry, una enfermedad de almacenamiento en lisosomas que resulta de una deficiente actividad de la α -Gal A, la identificación del defecto enzimático en 1967 (Brady, *et al.*, 1967, N. Eng. J. Med. 276: 1163) condujo a los primeros ensayos terapéuticos *in vitro* (Dawson *et al.*, 1973, Pediat. Res. 7: 694-690m) e *in vivo* (Mapes *et al.*, 1970, Science 169:987) de sustitución de α -Gal A, en 1969 y 1970, respectivamente. Estos y posteriores ensayos (Mapes *et al.*, 1970, Science 169: 987; Desnick *et al.*, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5326; y Brady, *et al.*, 1973, N. Engl. J. Med. 289:9), demostraron la efectividad bioquímica de la sustitución directa del enzima para esta enfermedad. Se administraron inyecciones repetidas de α -Gal A de plasma y bazo purificadas (100.000 U/inyección) a hemocigotos afectados durante un periodo de cuatro meses (Desnick *et al.*, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5326). Los resultados de estos estudios demostraron que (a) el aclaramiento en plasma de la forma de bazo era 7 veces más rápida que la de la forma de plasma (10 min. frente a 70 min.); (b) en comparación con la forma de bazo de la enzima, la forma de plasma llevaba a cabo una reducción del sustrato en plasma 25 veces más grande durante un periodo de tiempo notablemente más largo (48 horas frente a 1 hora); (c) no había evidencia de una respuesta inmunológica a seis dosis de cualquiera de las formas, administradas por vía intravenosa durante una periodo de cuatro meses, a dos hemocigotos afectados; y (d) se obtuvo una evidencia sugestiva que

indicaba que el sustrato almacenado en tejido se movilizaba hacia el interior de la circulación después de la reducción de la forma de plasma, pero no de la forma de bazo de la enzima. Por lo tanto, la enzima administrada no solo reducía el sustrato de la circulación (un sitio principal de acumulación), sino que también posiblemente movilizaba el sustrato previamente almacenado, desde otros depósitos hacia el interior de la circulación, para un posterior aclaramiento. Estos estudios indicaban el potencial para eliminar, o reducir de forma significativa, el almacenamiento glicolipídico patológico mediante una sustitución repetida de enzima.

Sin embargo, no se ha demostrado la efectividad bioquímica y clínica de la sustitución enzimática en la enfermedad de Fabry, debido a la falta de suficiente enzima humana para dosis adecuadas y una evaluación a largo plazo.

2.2. La enzima α -Gal A

La enzima α -Gal A humana tiene un peso molecular de aproximadamente 101.000 Da. En electroforesis en gel-SDS migra como una única banda de aproximadamente 49.000 Da, indicando que la enzima es un homodímero (Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307). La enzima α -Gal A se sintetiza como un precursor de 50.500 Da que contiene oligosacáridos fosforilados sensibles a endoglicosidasa H. Este precursor se procesa a una forma madura de aproximadamente 46.000 Da, a los 3-7 días después de su síntesis. Los intermediarios de este procesado no han sido definidos (Lemansky, *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262: 2062). Como con muchas enzimas lisosomales, la α -Gal A fija el objetivo hacia los lisosomas vía el receptor de manosa-6-fosfato. Esto se pone de manifiesto por la elevada tasa de secreción de esta enzima en células de mucopolidosis II y en fibroblastos tratados con NH_4Cl .

Se ha visto que la enzima contiene 5-15% de hidratos de carbono unidos a Asn (Ledonne, *et al.*, 1983, Arch. Biochem. Biophys. 224: 186). Se vio que la forma de tejido de esta enzima tenía ~ 52% de un tipo de elevado contenido en manosa y 48% de oligosacáridos de tipo complejo. El tipo elevado en manosa eluía a la vez, en cromatografía en Bio-gel, con Mang-gGlcNAc, mientras que los oligosacáridos tipo complejo eran de dos categorías que contenían 14 y 19-39 unidades de glucosa. Por iso-electroenfoque, se observan muchas formas de esta enzima dependiendo de las fuentes de la enzima purificada (forma de tejido frente a plasma). Sin embargo, mediante tratamiento con neuraminidasa, se observa una única banda (pI-5,1) que indica que esta heterogeneidad es debida a los diferentes grados de sialilación (del inglés "sialylation", en relación con el contenido en restos de ácido siálico) (Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256: 1307). Los esfuerzos iniciales de expresar el ADNc de longitud total que codifica la α -Gal A implicaron utilizar diversos vectores de expresión procariótica (Hantzopoulos and Calhoun, 1987, Gene 57:159; Ioannou, 1990, PhD. Thesis, City University of New York). Aunque se consiguió la expresión microbiana, como se puso de manifiesto por los ensayos enzimáticos de células de *E.coli* intactas y el crecimiento en melibiosa como la fuente de carbono, la proteína humana se expresó a niveles bajos y no fue posible purificarla de la bacteria. Estos resultados indican que la enzima recombinante era inestable debido a la falta de una glicosilación normal y/o la presencia de proteasas endógenas citoplásmicas o periplásmicas.

2.3. Enzimas lisosomales: biosíntesis y fijación del objetivo

Las enzimas lisosomales se sintetizan en polisomas unidos a membrana en el retículo endoplásmico rugoso. Cada proteína se sintetiza en forma de un precursor más grande que contiene un péptido señal amino-terminal hidrófobo. Este péptido interacciona con una partícula de reconocimiento de señal, una ribonucleoproteína 11S, y por la misma se inicia el transporte vectorial de la proteína naciente a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia el interior del lumen (Erickson, *et al.*, 1981, J. Biol. Chem. 256: 11224; Erickson, *et al.*, 1983, Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 275; Rosenfeld, *et al.*, 1982, J. Cell Biol. 93: 135). Las enzimas lisosomales son glicosiladas cotraduccionalmente por la transferencia "en bloc" de un gran oligosacárido preformado, glucosa-3, manosa-9, N-acetilglucosamina-2, a partir de un intermediario unido a lípido en el resto Asn de una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr en el polipéptido naciente (Kornfeld, R. & Kornfeld, S., 1985, Annu. Rev.

Biochem. 54:631). En el retículo endoplásmico, el péptido señal se escinde, y el procesado del oligosacárido unido a Asn comienza con la escisión de los tres restos de glucosa y una manosa de la cadena del oligosacárido.

Las proteínas se mueven vía un transporte vesicular al saco de Golgi donde sufren una serie de modificaciones posteriores a la traducción, y son clasificadas para una adecuada fijación del objetivo hacia los destinos específicos: lisosomas, secreción, membrana plasmática. Durante el movimiento a través del Golgi, la cadena de oligosacáridos en las glicoproteínas de membrana y secretoras es procesada al tipo complejo que contiene ácido siálico. Mientras que algunas de las cadenas de oligosacáridos en las enzimas lisosomales sufren un procesado similar, la mayoría sufren una serie diferente de modificaciones. La modificación más importante es la adquisición de restos fosfomanosílicos, los cuales sirven como componente esencial en el proceso de fijación del objetivo de estas enzimas hacia el lisosoma (Kaplan, *et al.*, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2026). Este marcador de reconocimiento es generado por la acción secuencial de dos enzimas del Golgi. Primero, la N-acetilglucosaminil-fosfotransferasa transfiere N-acetilglucosamina-1-fosfato del azúcar nucleotídico uridina difosfato-N-acetilglucosamina a los restos de manosa seleccionados en las enzimas lisosomales, para dar lugar a un intermediario fosfodiéster (Reitman & Kornfeld, 1981, J. Biol. Chem. 256: 4275; Waheed, *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257: 12322). A continuación, la N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster α -N-acetilglucosaminidasa separa el resto N-acetilglucosamina para exponer la señal de reconocimiento, manosa-6-fosfato (Varki & Kornfeld, 1981, J. Biol. Chem.

256:9937; Waheed, *et al.*, 1981, J. Biol. Chem. 256:5717).

Después de la generación de los restos fosfomanosílicos, las enzimas lisosomales se unen a los receptores de manosa-6-fosfato (M-6-P) en el aparato de Golgi. De esta forma las enzimas lisosomales permanecen intracelulares y se segregan de las proteínas las cuales están destinadas para secreción. A continuación el complejo ligando-receptor sale del aparato de Golgi vía una vesícula recubierta y es descargado en una zona de organización prelisosomal donde la disociación del ligando se produce por acidificación del compartimento (González-Noriega, *et al.*, 1980, J. Cell. Biol. 85:839). El receptor se recicla de vuelta al aparato de Golgi, mientras que las enzimas lisosomales son empaquetadas en el interior de vesículas para formar lisosomas primarios. Aproximadamente, del 5-20% de las enzimas lisosomales no circulan hacia los lisosomas y presumiblemente son secretadas, por defecto. Una parte de estas enzimas secretadas pueden ser recapturadas por el receptor de M-6-P encontrado en la superficie de las células y ser internalizadas y descargadas en los lisosomas (Willingham, *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6967).

Se han identificado dos receptores de manosa-6-fosfato. Se ha purificado una glicoproteína de 215 kDa de una diversidad de tejidos (Sahagian, *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 4289; Steiner & Rome, 1982, Arch. Biochem. Biophys. 214: 681). La unión de este receptor es independiente de catión divalente. También se ha aislado un segundo receptor de M-6-P, el cual difiere del receptor de 215 kDa en que tiene un requerimiento para cationes divalentes. Por consiguiente, este receptor se denomina el catión-dependiente (M-6-P^{CD}), mientras que el de 215 kDa se denomina catión-independiente (M-6-P^{CI}). El receptor M-6-P^{CD} parece ser un oligómero con tres subunidades con un peso molecular de subunidad de 46 kDa.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una α -galactosidasa A humana secretada, que comprende:

- (a) amplificar una secuencia de nucleótidos de α -galactosidasa A en una célula CHO modificada por ingeniería genética que expresa α -galactosidasa A y dihidrofolato reductasa (DHFR);
- (b) cultivar dicha célula en condiciones en las que la α -galactosidasa A se sobreexpresa dando como resultado la formación de estructuras cristalinas que contienen α -galactosidasa A humana en vesículas limitadas por membrana, y en las que dicha α -galactosidasa se secreta al medio de cultivo celular; y
- (c) aislar dicha α -galactosidasa A del medio de cultivo celular,

en el que dicha α -galactosidasa A contiene manosa-6-fosfato, y en el que la célula puede obtenerse por crecimiento por etapas en concentraciones de metotrexato crecientes hasta 1000 μ M. El sistema de expresión en células CHO descrito en la presente memoria, proporciona las adecuadas modificaciones, junto con la traducción y posteriores a la traducción, que se requieren para un adecuado procesado, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, etc., y la clasificación del producto de expresión, de forma que se produce una enzima activa.

Aunque Ioannou (Tesis Doctoral, 1990) describió estudios de sobre-expresión con α -Gal A, el método reivindicado para producir α -galactosidasa A humana no se describieron ni se sugirieron en ese documento. Específicamente, Ioannou no sugirió usar crecimiento por etapas en concentraciones de metotrexato crecientes hasta 1000 μ M, y los métodos desvelados en el mismo no dieron como resultado la formación de estructuras cristalinas que contenían α -galactosidasa A humana en vesículas limitadas por membrana.

Utilizando los métodos descritos en la presente memoria, la α -Gal A recombinante es secretada por las células hospedantes CHO manipuladas por ingeniería genética, de forma que se recupera del medio de cultivo en un buen rendimiento. La α -Gal A producida de acuerdo con el método de la invención se puede utilizar para una variedad de fines, incluyendo, pero no estando limitados a, el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la conversión del tipo sanguíneo B a O, o en cualquier proceso comercial que implique la hidrólisis de restos α -D--galactosilo de glicoconjugados.

Esta invención describe un método por el cual se sobre-expresa y secreta α -Gal A, que normalmente fija su objetivo intracelularmente, de una línea de células CHO recombinantes.

3.1. Definiciones

Según se utiliza en la presente memoria, los siguientes términos y abreviaturas tendrán el significado indicado:

α -Galactosidasa A	α -Gal A
α -N-Acetilgalactosaminidasa	α -GalNAc
Par o pares de bases	pb

	Ovario de hámster chino	CHO
	ADN complementario	ADNc
	cuentas por minuto	cpm
	ácido desoxirribonucleico	ADN
5	Medio de Eagle modificado de Dulbecco	DMEM
	suero de ternera fetal	FCS
	pares de kilobases	kb
	kilodalton	kDa
	manosa-6-fosfato	M-6-P
10	metotrexato	MTX
	4-metilumbeliferil- α -D--galactósido	4-Mu- α -Gal
	4-metil-umbeliferil- α -N-acetil-galactosamina	4-Mu- α -GalNac
	microgramos	μ g
	micrómetro	μ m
15	nanogramos	ng
	nanómetro	nm
	nucleótido	nt
	p-nitrofenil- α -N-Acetilgalactosaminida	pNp- α -GalNac
	electroforesis en gel de poliacrilamida	PAGE
20	reacción en cadena de la polimerasa	PCR
	ácido ribonucleico	ARN
	dodecilsulfato sódico	SDS
	unidades	u

4. Descripción de las figuras

- 25 FIG. 1A-1C. Secuencia de ADNc de longitud completa de α -Gal humana. Las secuencias de aminoácidos de péptidos N-terminales, por bromuro de cianógeno (CB) y trípticos (T), obtenidas por microsecuenciación peptídica, se indican mediante subrayado. Se muestran las diferencias de la secuencia predicha a partir del ADNc. Se indican los cuatro sitios putativos de N-glicosilación y las señales de terminación 3' se señalan con una línea cortada por encima.
- 30 FIG. 1D-1F. El alineamiento de las secuencias aminoácidos deducido de los ADNc de longitud completa que codifican α -Gal-NAc (α -Gal B) humana, α -Gal, Mel 1 de levadura, y Mel A de E. coli. Dos puntos, residuos idénticos; puntos sencillos, aminoácidos isofuncionales y cajas, residuos idénticos en α -GALNAC, α -GAL, Mel 1 y/o Mel A. Se introdujeron huecos para el alineamiento óptimo. Las líneas verticales numeradas indican límites de exón para α -GAL (Bishop, et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3903-3907).
- 35 FIG. 1G. Construcción del vector de expresión de α -GAL de mamíferos p91-AGA. El ADNc de longitud completa se escindió del plásmido pcDAG126, se adaptó por la adición de enlazadores Eco RI y se clonó posteriormente en el sitio Eco RI el vector de expresión p91023 (B).
- 40 FIG. 2A-2B. Expresión transitoria de α -Gal humana en células cos-1. La actividad máxima (U/mg) se alcanzó 72 horas después de la transfección en células que recibieron la biomolécula artificial p91-AGA. No se observó aumento en la actividad α -Gal en células que no reciben ADN de plásmido ni en células que reciben el vector p91 con ADNc de α -Gal en orientación inversa.
- FIG. 3A-3B. Efecto del suero en la secreción de α -Gal recombinante por CHO DG5.3. Las células se sembraron en

placas en DMEM suplementado con la concentración adecuada de suero (FIG. 3A). Las células se sembraron en placas en DMEM suplementado con FCS 10%. Después de la confluencia (aproximadamente 4 días), los medios se reemplazaron con DMEM nuevo suplementado con la concentración adecuada de suero (FIG. 3B).

5 FIG. 4. Producción de alto nivel de α -Gal recombinante en un biorreactor de fibras huecas. La cantidad de suero bovino fetal requerido por este sistema para crecimiento celular óptimo y secreción de proteínas puede disminuirse hasta aproximadamente 1%.

FIG. 5. SDS-PAGE de cada etapa del esquema de purificación de α -Gal. Calles 1, 6, marcadores de peso molecular; calle 2, medios brutos; calle 3, cromatografía de afinidad; calle 4, cromatografía de octil-Sefarosa; calle 5, cromatografía de superosa 6.

10 FIG. 6. Celular total (calles 1-4) y en medios (calles 5-8) de células control DG44 (calle 1, 5), células DG5 (calles 2, 6), células DG5.3 (calles 3, 7) y células DG11 (calles 4, 8), marcadas con [35S]-metionina.

FIG. 7A-7C. Propiedades físico-cinéticas del α -Gal recombinante. Km hacia el sustrato artificial 4-MU- α -D-galactopiranosido (FIG. 7A). Punto isoeléctrico de enzima recombinante y purificada de plasma humano (FIG. 7B). pH óptimo de la enzima recombinante. (FIG. 7C).

15 FIG. 8A-8B. Degradación de P-C13STH mediante células CHO DG5.3 que sobre-producen α -Gal humana. La degradación rápida de este sustrato se observa mediante la acumulación de P-C13SDH.

FIG. 9. Adquisición de puentes disulfuro mediante α -Gal recombinante. Las células CHO DG5.3 se marcaron con [35S]-metionina y se siguieron para los tiempos indicados. SDS-PAGE en ausencia de un agente reductor revela la formación de estructuras secundarias a través de la formación del enlace disulfuro.

20 FIG. 10. Llegada del α -Gal de nueva síntesis a la red del Golgi detectada por la adquisición de oligosacáridos resistentes a Endo H.

FIG. 11. Tasa de secreción de α -Gal recombinante. Las células CHO DG5.3 se marcaron con [35S]-metionina durante 5 minutos y se siguieron con metionina fría. Las alícuotas de los medios de cultivo se retiraron en los tiempos indicados y se inmunoprecipitaron con anticuerpos policlonales anti- α -Gal.

25 FIG. 12. SDS-PAGE de los medios de cultivo de células DG44 (calle 1; control), DG5 (calle 2) y DG5.3 (calles 3, 4) marcadas con [35S]-metionina durante 1 hora (calles 1-3) y 24 horas (calle 4).

30 FIG. 13. Análisis de los restos de hidratos de carbono en α -Gal recombinante. Las células CHO DG5.3 se marcaron con [35S]-metionina durante 24 horas, los medios de cultivo se recogieron y la enzima recombinante se inmunoprecipitó. Las alícuotas se digirieron con endo D (calle 2), Endo H (calle 3), Endo F (calle 4), PNGasa F (calle 5), Endo D y H (calle 6), Endo H y F (calle 7) y Endo H, F y PNGasa F (calle 8). Muestras no tratadas (calles 1, 9).

FIG. 14. Formas celulares (calles 1, 3) y secretadas (calles 2, 4) de α -Gal recombinante tratada con PNGasa F (calles 3, 4). Controles (calles 1, 2).

FIG. 15. Efecto de los inhibidores de glicosilación en la secreción de α -Gal recombinante.

35 FIG. 16. Marcaje con 32 P de CHO DG44 (calles 2, 3) y DG5.3 (calles 1, 4). α -Gal se inmunoprecipitó de las células (calles 1, 2) y los medios (calles 2, 3).

FIG. 17A-17D. Cromatografía QAE-Sephadex de oligosacáridos sensibles a endo H de α -Gal recombinante. Oligosacáridos no tratados, tratados con HCl diluido, tratados con neuraminidasa y tratados con fosfatasa alcalina.

FIG. 18. Oligosacáridos sensibles a Endo H de α -Gal recombinante, cromatografiados en un receptor M-6-P. Círculos llenos, pico menos 4, círculos vacíos, picos menos 2.

40 FIG. 19. Cromatografía de α -Gal recombinante en el receptor M-6-P. Células DG5.3 marcadas con [35S]-metionina durante 24 horas y medios recogidos para cromatografía. Círculos llenos, actividad α -Gal; cajas vacías, radioactividad total.

45 FIG. 20A-20C. Cromatografía de afinidad de α -Gal recombinante y humana en receptor M-6-P. Las células se marcaron con [35S]-metionina durante 24 horas en presencia de NH₄Cl y se recogieron los medios de cultivo. Las secreciones de DG5.3 (FIG. 20A) secreciones MS914 (FIG. 20B) y secreciones 293 (FIG. 20C). Círculos llenos, actividad α -Gal. Cuadrados, radioactividad total. Círculos vacíos, gradiente de M-6-P usado para elución.

FIG. 21. Captación de α -Gal recombinante por fibroblastos de Fabry. Las células se incubaron a las cantidades indicadas de α -Gal durante 6 horas. Círculos vacíos, captación de α -Gal, círculos llenos, captación en presencia de M-6-P 2 mM.

FIG. 22. Esquema de construcción de la fusión α -Gal con proteína A. La fusión se realizó en dos reacciones PCR separadas como se describe en la sección 9.1.

FIG. 23. Secuencia de nucleótidos del dominio E de la proteína A, secuencia de escisión de colagenasa y secuencia 3' de α -Gal (23A). Esquema de la biomolécula artificial de fusión que muestra consenso de colagenasa en relación con los dominios de α -Gal y proteína A (23B).

FIG. 24A-24B. Aclaramiento en plasma después de la administración intravenosa a ratones de la α -galactosidasa A humana recombinante secretada que contiene restos de α 2,6-ácido siálico (Δ -- Δ) y la glicofoma no sialilada en α 2,6 (\bullet -- \bullet) gráfico superior, en comparación con el aclaramiento en plasma de estas glicofomas después del tratamiento con fosfatasa ácida. Cada punto representa la media de los valores de dos inyecciones independientes. Los valores $T_{1/2}$ se estimaron por extrapolación.

FIG. 25. Distribución en tejido de diferentes formas de α -Gal recombinante humana secretada después de la administración intravenosa en ratones. Cada punto representa la media de los valores de dos inyecciones independientes.

FIG. 26. Las células DG5.3-1000Mx CHO contienen estructuras cristalinas de α -Gal A humana sobre-expresada. Micrografías electrónicas de células DG5.3-1000Mx que muestran estructuras cristalinas en vacuolas sencillas limitadas por membrana (26A) y en vesículas, probablemente en el trans-Golgi dilatado (26B; bar, 0,15 μ m y 0,10 μ m, respectivamente). 26C y D: localización microscópica inmunoelectrónica de α -Gal A humana con partículas de oro coloidales de 10 nm (bar, 0,31 μ m snf 0,19 μ m, respectivamente). 26E: Micrografía electrónica de células DG44 de dfhr parentales (bar, 1,11 μ m); inserción que muestra complejo de Golgi (flechas) en células dfhr DG44 (bar, 0,5 μ m).

FIG. 27A-27C. La agregación de α -Gal A secretada purificada es dependiente de concentración de enzima y pH. 27A: Precipitación de α -Gal A (10 mg/ml) con pH decreciente. Adviértase que aproximadamente 12% de la enzima incubada se precipitó a pH 6,0, el pH estimado de la red del trans-Golgi (TGN). 27B: Turbidez de concentraciones crecientes de α -Gal secretada a pH 5,0 (círculos llenos) y pH 7,0 (triángulos llenos) en ausencia de la albúmina de suero bovino (BSA). Como control para precipitación no específica con concentración creciente de proteína, se mezcló α -Gal A secretada (1 mg/ml) con concentraciones crecientes de BSA (0,1 a 10 mg/ml) a pH 5,0 (cuadrados llenos). 27C: SDS-PAGE de las fracciones sobrenadantes y precipitadas de mezclas de α -Gal A secretada purificada (10 mg/ml) y BSA (2 mg/ml) incubadas a valores de pH decrecientes. Adviértase que α -Gal A se precipitó con pH decreciente mientras que las concentraciones de BSA soluble y precipitada permaneció esencialmente sin cambios.

FIG. 28. Modelo de Agregación-Secreción para Secreción Selectiva de α -Gal A humana sobre-expresada en células CHO. La sobre-expresión de alto nivel de Células CHO de α -Gal A humana u otras enzimas lisosomales normalmente orientadas hacia lisosomas da como resultado su secreción selectiva debido a su agregación y la inaccesibilidad resultante de sus señales M6PR. Las enzimas sufren un procesado post-traduccional normal hasta que llegan al TGN, donde la enzima sobre-expresada sufre interacciones proteína a proteína y forma agregados de partículas más pequeños solubles y más grandes, debido al pH menor del TGN. El TGN se dilata con la enzima sobre-expresada. Algunos agregados y enzima soluble con señales de M6P expuestas se transportan a lisosomas, mientras que la mayoría de los agregados cuyos M6P no están accesibles se exocitan por defecto a través de la vía de secreción constitutiva. También puede darse un descenso de la sulfatación puesto que las tirosinas de los agregados enzimáticos destinadas para secreción no están disponibles para la sulfotransferasa. El modelo puede explicar la secreción selectiva de otras proteínas sobre-expresadas que normalmente se dirigen a orgánulos específicos.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la producción de una α -galactosidasa A humana secretada, que comprende:

- (a) amplificar una secuencia de nucleótidos de α -galactosidasa A en una célula CHO modificada por ingeniería genética que expresa α -galactosidasa A y dihidrofolato reductasa (DHFR);
- (b) cultivar dicha célula en condiciones en las que la α -galactosidasa A se sobreexpresa dando como resultado la formación de estructuras cristalinas que contienen α -galactosidasa A humana en vesículas limitadas por membrana, y en las que dicha α -galactosidasa se secreta al medio de cultivo celular; y
- (c) aislar dicha α -galactosidasa A del medio de cultivo celular,

en el que dicha α -galactosidasa A contiene manosa-6-fosfato, y en el que la célula puede obtenerse por crecimiento por etapas en concentraciones de metotrexato crecientes hasta 1000 μ M. La producción y expresión con éxito de esta enzima purificada, biológicamente activa, según se describe y ejemplifica en la presente memoria, es particularmente significativa por una serie de razones. Por ejemplo, los esfuerzos en el pasado de expresar el ADNc de longitud total que codifica la α -Gal utilizando varios vectores de expresión procariótica, dio por resultado la

expresión del enzima, como se puso de manifiesto por ensayos enzimáticos de células hospedantes microbianas intactas y el crecimiento sobre melibiosa como la fuente de carbono; sin embargo, la enzima humana se expresaba a niveles bajos y no se podía purificar de las bacterias. Estos resultados indican que la enzima recombinante expresada en sistemas microbianos era inestable debido a la falta de glicosilación normal y/o la presencia de proteasas citoplásmicas o periplásmicas endógenas.

Los esfuerzos para expresar esta enzima en sistemas de expresión eucariótica eran igualmente difíciles por diferentes razones. La α -Gal A es una enzima lisosomal codificada por un gen "housekeeping". El producto de traducción primaria está altamente modificado y procesado, requiriendo una serie compleja de sucesos que implican escisión de una secuencia señal, glicosilación, fosforilación y sialilación, los cuales pueden ser efectuados correctamente solamente por células hospedantes adecuadas. Además, puesto que el producto de expresión está destinado para el lisosoma, el cual permanece intracelular, es bastante sorprendente que los métodos descritos en la presente memoria permitan la secreción de una molécula adecuadamente procesada, biológicamente activa.

La α -Gal A biológicamente activa, producida de acuerdo con el método de la invención, tiene una variedad de utilidades, siendo probablemente la más significativa su utilización en terapia de sustitución de enzima para el trastorno de almacenamiento lisosomal, la enfermedad de Fabry. Por ejemplo, el defecto metabólico en fibroblastos cultivados de la enfermedad de Fabry se puede corregir in vitro por la adición de α -Gal A exógena en el medio de cultivo. Además, ensayos limitados en humanos han mostrado la efectividad bioquímica de la sustitución de enzima para reducir el sustrato en circulación antes de la deposición vascular. Sin embargo, antes de la presente invención no se podían producir grandes cantidades de α -Gal A humana purificada, biológicamente activa, para su utilización en terapias de sustitución. La α -Gal A producida de acuerdo con el método de la invención también tiene una serie de usos industriales, p.e. en cualquier proceso que implique la hidrólisis de α -D--galactosil glicoconjugados, la conversión de grupo sanguíneo B a grupo O, etc., según se describe en la presente memoria.

La invención se divide en las siguientes secciones únicamente para la finalidad de descripción: (a) la secuencia codificadora para α -Gal A; (b) construcción de un vector de expresión el cual dirigirá la expresión de la secuencia codificadora del enzima; (c) transfección de células hospedantes adecuadas, las cuales pueden replicar, traducir y procesar adecuadamente los transcritos primarios con el fin de expresar un producto génico biológicamente activo; y (d) identificación y/o purificación de la enzima producida de esa manera. Una vez que se identifica un transformante que expresa elevados niveles de enzima biológicamente activa, la práctica de la invención implica la ampliación y utilización de ese clon en la producción y purificación de α -Gal A biológicamente activa.

La invención se demuestra en la presente memoria por medio de ejemplos en los cuales se clonó ADNc de α -Gal A y se expresó en un sistema de expresión de células CHO. También se describen las modificaciones a las secuencias codificadoras de ADNc las cuales mejoran el rendimiento y simplifican la purificación sin restar valor a la actividad biológica. Además, se describen modificaciones para las células hospedantes que permiten la expresión de glicofomas asialiladas de la enzima, ambas de las cuales se pueden purificar fácilmente.

Diversos aspectos de la invención se describen en más detalle en las subsecciones más adelante y en los ejemplos que siguen. En la medida en que dichas subsecciones y ejemplos o partes de los mismos no están relacionados con el método reivindicado de la invención, se proporcionan solamente para información técnica.

5.1. La secuencia codificadora de α -Gal A

La secuencia codificadora de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida para la α -Gal A se muestra en la FIG. 1A-1C. Esta secuencia de nucleótidos, o fragmentos o equivalentes funcionales de la misma, se pueden utilizar para generar moléculas de ADN recombinante que dirigen la expresión del producto enzimático, o péptidos funcionalmente activos o equivalentes funcionales de los mismos, en células hospedantes adecuadas.

Debido a la degeneración de la secuencia codificadora de nucleótidos, en la práctica de la invención se pueden utilizar otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos que las mostradas en la FIG. 1A-1C, para la clonación y la expresión de α -Gal A. Dichas alteraciones incluyen deleciones, adiciones o sustituciones de diferentes restos de nucleótidos que dan por resultado una secuencia que codifica el mismo producto génico, o uno funcionalmente equivalente. El producto génico puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de restos de aminoácidos dentro de la secuencia, lo cual da por resultado un cambio silencioso de forma que se produce un producto bioactivo. Dichas sustituciones de aminoácidos se pueden realizar basándose en la semejanza en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, la naturaleza anfipática de los restos implicados y/o basándose en datos cristalográficos. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; aminoácidos con grupos polares en cabeza, sin carga, con valores de hidrofiliidad similares, incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, tirosina.

Las secuencias codificadoras para la α -Gal A se pueden obtener de forma adecuada a partir de microorganismos o líneas celulares manipuladas por ingeniería genética que contienen las secuencias codificadoras del enzima, tales como las realizaciones depositadas descritas en la presente memoria. Por otra parte, las secuencias genómicas o

las secuencias codificadoras de ADNc para estas enzimas se pueden obtener a partir de genotecas genómicas humanas o de ADNc. Las genotecas bien sea genómicas, o de ADNc, se pueden preparar a partir de fragmentos de ADN generados de fuentes de células humanas. Los fragmentos que codifican la α -Gal A se pueden identificar rastreando dichas genotecas con una sonda nucleotídica que es sustancialmente complementaria a cualquier parte de la secuencia que se muestra en la FIG. 1A-1C. De hecho, las secuencias generadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se pueden ligar para formar la secuencia de longitud total. Aunque se pueden utilizar las partes de las secuencias codificadoras, pueden ser preferibles para la expresión los clones de longitud completa, es decir, los que contienen la región codificadora completa. Por otra parte, las secuencias codificadoras que se presentan en la FIG. 1A-1C, se pueden alterar por la adición de secuencias que se pueden utilizar para incrementar los niveles de expresión y/o facilitar la purificación. Por ejemplo, como se demuestra en las realizaciones de trabajo descritos en la presente memoria, la secuencia codificadora de α -Gal A se modificó mediante la adición de la secuencia de nucleótidos que codifica el sitio de escisión para colagenasa seguido de la Proteína A de Estafilococo. La expresión de esta biomolécula artificial génica quimérica dio como resultado una proteína de fusión que consiste en α -Gal A – el sustrato de colagenasa – Proteína A. Esta proteína de fusión se purificó exhaustivamente usando una columna con IgG que se une al resto de Proteína A. La α -Gal A no fusionada se liberó de la columna mediante tratamiento con colagenasa que escindió la α -Gal A del resto de Proteína A unido a la columna. Se pueden manipular por ingeniería genética otros sustratos de escisión enzimática y proteínas de unión para la producción de α -Gal A, los cuales se pueden purificar fácilmente y liberar en su forma biológicamente activa.

Se pueden utilizar métodos bien conocidos para los expertos en la técnica para el aislamiento de ADN, generación de los fragmentos de restricción adecuados, construcción de clones y genotecas, y rastreo de recombinantes. Para una revisión de dichas técnicas, véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, N.Y. Capítulos 1-18.

Como alternativa se podría sintetizar la secuencia codificadora de la FIG. 1A-1C, en su totalidad o en parte, utilizando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Caruthers, *et al.*, 1980, *Nuc. Res. Sym. Ser. 7: 215-233*; Crea & Horn, 1980, *Nuc. Acids Res. 9(10): 2331*; Matteucchi & Carruthers, 1980, *Tetrahedron Letters 21: 719*; and Chow and Kempe, 1981, *Nuc. Acids Res. 9(12): 2807-2817*.

Como alternativa la propia proteína podría producirse usando métodos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos que se presenta en la FIG. 1A-1C completa o en parte. Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante técnicas de fase sólida, escindir de la resina y purificarse mediante cromatografía líquida de alta resolución preparatoria. (Por ejemplo, véase, Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N.Y. pp. 50-60). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman; véase Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N.Y., pp. 34-39).

La α -Gal A humana es una glicoproteína homodimérica. El ADNc de longitud completa de la α -Gal A predice una subunidad madura de 398 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos tiene una homología, en conjunto, de alrededor del 50% con la α -N-acetilgalactosaminidasa (α -Gal B) humana. Búsquedas de homología con bases de datos computerizadas revelaron regiones cortas de homología de α -Gal A con las secuencias de aminoácidos Mel 1 de levaduras y Mel A de E.coli (véase FIG. 1D-1F). Es probable que estas regiones conservadas sean importantes para la conformación, estabilidad, asociación de subunidades y/o catálisis de enzimas. Así, se prefiere no alterar dichas regiones conservadas. Sin embargo, determinadas modificaciones en la secuencia codificadora pueden ser ventajosas. Por ejemplo, se podrían borrar de forma selectiva las cuatro secuencias consenso de glicosilación ligada a N, alterando de ese modo la glicosilación del enzima y afectando a la fosforilación, sialilación, sulfatación, etc. Dichas enzimas modificadas pueden tener propiedades de aclaramiento y de fijación de objetivo alteradas, cuando se inyectan en pacientes con enfermedad de Fabry.

Las modificaciones de oligosacáridos pueden ser útiles en la fijación del objetivo de la α -Gal A, para una terapia enzimática efectiva. Algunos ejemplos de dichas modificaciones se describen en más detalle más adelante. Estudios previos demostraron que la glicofoma de plasma de la α -Gal, la cual está más altamente sialilada que la glicofoma de bazo, era más efectiva en la reducción del sustrato tóxico acumulado en circulación de pacientes con enfermedad de Fabry (Desnick *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5326-5330*). Los estudios que caracterizaron las glicofomas de plasma y bazo purificadas de la enzima, revelaron diferencias solamente en sus restos de oligosacáridos (Desnick *et al.*, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5326-5330*). Así, los esfuerzos para fijar el objetivo de la enzima recombinante para un tratamiento efectivo de la enfermedad de Fabry pueden ser potenciados por la modificación de los sitios de N-glicosilación.

También, las regiones codificadoras y no traducidas 5' de la secuencia de nucleótidos se podría alterar para mejorar la eficacia de traducción del ARNm de la α -Gal A. Por ejemplo, la sustitución de una citosina por la guanosina en posición +4 del ADNc de α -Gal A podría mejorar la eficacia de traducción del ARNm de α -Gal A, de 5 a 10 veces (Kozak, 1987, *J. Mol. Biol. 196:947-950*).

Además, basándose en datos de cristalografía de rayos X, se podrían llevar a cabo alteraciones de secuencia para mejorar la estabilidad proteica, p.e., introduciendo puentes disulfuro en las posiciones adecuadas, y/o eliminando o

sustituyendo los aminoácidos que se predice que causan inestabilidad de proteínas. Éstos solamente son ejemplos de modificaciones que se pueden introducir por ingeniería genética en la enzima α -Gal A para producir una proteína más activa o estable, más proteína enzimática, o incluso cambiar la especificidad catalítica de la enzima.

5.2. Producción de α -Gal A recombinante

5 Con el fin de expresar una α -Gal A biológicamente activa, se inserta la secuencia codificadora para la enzima, un equivalente funcional, o una secuencia modificada, según se describe en la Sección 5.1., anterior, en un vector de expresión eucariota adecuado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada en células hospedantes eucariotas adecuadas, las cuales poseen la maquinaria celular y los elementos para un adecuado procesamiento, es decir, escisión de señal, glicosilación, fosforilación, sialilación, y clasificación de la proteína. Se prefieren los sistemas de expresión de la célula Hospedante de mamífero para la expresión de enzimas biológicamente activas que se pliegan y procesan adecuadamente; cuando se administra en humanos, dichos productos de expresión deben mostrar una adecuada fijación del objetivo en tejidos y ninguna reacción inmunológica adversa.

5.2.1. Construcción de vectores de expresión y preparación de transfectantes

15 Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificadora de α -Gal A, y señales de control de transcripción/traducción adecuadas. Estos métodos incluyen recombinación in vitro/recombinación genética. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. Capítulo 12.

20 Se pueden utilizar una diversidad de sistemas de expresión en hospedantes eucariotas para expresar la secuencia codificadora de α -Gal A. Aunque los sistemas procarióticos ofrecen la clara ventaja de facilidad de manipulación y bajo coste de escalado, su mayor inconveniente en la expresión de α -Gal A es su falta de las adecuadas modificaciones posteriores a la traducción de las proteínas de mamífero expresadas. Los sistemas eucariotas, y preferiblemente los sistemas de expresión en mamíferos permiten que se produzca la adecuada modificación. Las células eucariotas, las cuales poseen la maquinaria celular para un adecuado procesamiento del transcrito primario, glicosilación, fosforilación, y de forma ventajosa, la secreción del producto génico, se deben utilizar como células hospedantes para la expresión de la α -Gal A. Se prefieren líneas celulares de mamíferos. Dichas células hospedantes pueden incluir, pero no están limitadas a, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, -293, WI38, etc. Como alternativa, se pueden modificar las células hospedantes eucariotas que poseen algo de, pero no toda, la maquinaria celular requerida para el procesamiento opcional del transcrito primario, y/o el procesamiento posterior a la traducción y/o secreción del producto génico, para potenciar las capacidades de procesamiento de las células hospedantes. Por ejemplo, se puede manipular por ingeniería genética en la línea celular hospedante una secuencia de nucleótidos recombinante que codifica un producto peptídico que lleva a cabo una función de procesamiento que la célula hospedante no había sido capaz de realizar previamente. Una secuencia de ese tipo puede ser, bien sea co-transfectada en la célula hospedante junto con el gen de interés, o incluida en la biomolécula artificial recombinante que codifica el gen de interés. Por otra parte, se pueden producir líneas celulares que contienen esta secuencia, las cuales a continuación son transfectadas con el gen de interés.

Se deben utilizar vectores de expresión eucariotas adecuados para dirigir la expresión de α -Gal A en la célula hospedante elegida. Por ejemplo, se pueden seguir al menos dos métodos básicos para el diseño de vectores en SV40. El primero es sustituir la región temprana de SV40 con el gen de interés, mientras que el segundo es sustituir la región tardía (Hammarskjöld, *et al.*, 1986, Gene 43:41). Los vectores con sustitución de las regiones temprana y tardía también se pueden complementar in vitro por el mutante adecuado de SV40 que carece de la región temprana o tardía. Dicha complementación producirá recombinantes los cuales están metidos en cápsidas infecciosas y los cuales contienen el gen α -Gal A. A continuación una línea celular permisiva puede ser infectada para producir la proteína recombinante. Los vectores que se basan en SV40 también se pueden utilizar en estudios de expresión transitoria, donde los mejores resultados se obtienen cuando se introducen en células COS (CV-1, origen de SV40), un derivado de CV-1 (células de riñón de mono verde), las cuales contienen una única copia de un genoma de SV40 defectuoso en origen, integrado en el cromosoma. Estas células sintetizan activamente el antígeno T grande (SV40), iniciando así la replicación desde cualquier plásmido que contenga un origen de replicación de SV40.

50 Además del SV40, se pueden utilizar casi todos los virus o retrovirus clonados molecularmente como vehículo de clonación o expresión. Para la expresión se pueden utilizar vectores virales en base a una serie de retrovirus (aviar y múrvido), adenovirus, virus vacunal (Cochran, *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:19) y poliomavirus. Otros virus clonados, tales como JC (Howley, *et al.*, J. Virol. 36:878), BK y los virus de papiloma humano (Heilman, *et al.*, 1980, J. Virol. 36:395), ofrecen el potencial de ser utilizados como vectores de expresión eucariótica. Por ejemplo, cuando se utilizan vectores de expresión en adenovirus, la secuencia codificadora de α -Gal A se puede ligar a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, p.e. la secuencia líder tripartita y promotora tardía. A continuación se puede insertar este gen quimérico en el genoma del adenovirus, por recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p.e. región E1 o E3), dará por resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar la enzima humana en hospedantes infectados (p.e. véase Logan &

Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659). Como alternativa, se puede utilizar el promotor 7.5K del virus vacunal. (p.e. véase, Mackett *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7415-7419; Mackett *et al.*, 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicali *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:4927-4931). Los vectores en base a virus de papiloma bovino (Sarver, *et al.*, 1981, Mol. Cell. Biol. 1: 486) son de particular interés. Estos vectores tienen la capacidad de replicarse como elementos extracromosomales. Poco después de la entrada de este ADN a las células de ratón, el plásmido se replica a alrededor de 100 a 200 copias por célula. La transcripción del ADN insertado no requiere la integración del plásmido en el cromosoma del hospedante, produciendo de ese modo un elevado nivel de expresión. Estos vectores se pueden utilizar para una expresión estable incluyendo un marcador seleccionable en el plásmido, tal como el gen neo. También se puede conseguir un elevado nivel de expresión utilizando promotores inducibles tales como el promotor IIA de metalotionina, promotores de choque térmico, etc.

Se prefiere una expresión estable para una producción a elevado nivel de proteínas recombinantes, a largo plazo. Por ejemplo, después de la introducción del ADN extraño, se puede dejar que las células manipuladas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en medios enriquecidos y a continuación cambiar a un medio selectivo. Más que utilizar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación virales, las células hospedantes se pueden transformar con la α -Gal A o ADN controlado por elementos adecuados de control de expresión (p.e., promotor, potenciador, secuencias, finalizadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos, que a su vez se pueden clonar y ampliar en líneas celulares. Se pueden utilizar una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero no estando limitados a genes de timidina quinasa (Wigler, *et al.*, 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y adenina fosforibosiltransferasa del virus del herpes simple (Lowy, *et al.*, 1980, Cell 22:817) se pueden emplear en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También se puede utilizar la resistencia a antimetabolitos como la base de la selección para genes dhfr, el cual confiere resistencia al metotrexato (Wigler, *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'hare, *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527), gpt, el cual confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072; neo, el cual confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1), e hygro, el cual confiere resistencia a higromicina (Santerre, *et al.*, 1984, Gene 30:147). Recientemente, se han descrito más genes seleccionables, a saber, trpB, el cual permite utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, el cual permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047) y ODC (ornitina descarboxilasa), el cual confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue L., 1987, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

Como alternativa los sistemas de expresión eucariotas que pueden usarse para expresar las enzimas α -Gal A son de levaduras transformados con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificadora de α -Gal A; los sistemas celulares de insecto infectados con los vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen la secuencia codificadora de α -Gal A; o los sistemas de células vegetales infectados con los vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus mosaico de la coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia codificadora de α -Gal A.

En levaduras, pueden utilizarse múltiples vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Como revisión véase, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, ed. Ausubel *et al.*, Green Publish. Assoc. & Wiley Interscience, ch. 13; Grant *et al.*, 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, en Methods in Enzymology, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; y Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Eds. Verger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684; y The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, 1982, Eds. Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II. Para los ensayos de complementación en levaduras, se pueden clonar ADNc para α -Gal A en plásmidos episomales de levadura (YEp) que se replica de forma autónoma en levadura debido a la presencia del círculo 2μ de levadura. El ADNc puede clonarse tras un promotor constitutivo de levadura tal como ADN o LEU2 o un promotor inducible tal como GAL (Cloning in Yeast, Chpt. 3, R. Rothstein en: DNA Cloning Vol. 11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, 1986, IRL Press, Wash. D.C.). Las construcciones pueden contener las regiones 5' y 3' no traducidas del ARNm de α -Gal A conocido o de los que corresponde a un gen de levadura. Los plásmidos YEp transforman con alta eficacia y los plásmidos son extremadamente estables. Como alternativa, pueden usarse vectores que promueven la integración de secuencias de ADN ajeno en el cromosoma de levadura.

En los casos en los que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de la secuencia codificadora de α -Gal A puede dirigirse mediante cualquiera de múltiples promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales tales como los promotores de ARN 35S y ARN 19S de CaMV (Brisson *et al.*, 1984, Nature 310:511-514), o el promotor de proteína de cubierta de TMV (Takamatsu *et al.*, 1987, EMBO J. 6:307-311); como alternativa, pueden usarse promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi *et al.*, 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie *et al.*, 1984, Science 224:38-843); o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17,5-E o hsp17,3-B de soja (Gurley *et al.*, 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus vegetales; transformación directa de ADN;

microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de tales técnicas véase, por ejemplo, Wissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, pp. 421-463; y Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed. Blackie, Londres, Ch. 7-9.

5 Un sistema de expresión alternativo que podría usarse para expresar α -Gal A es un sistema de insectos. En un sistema tal, se utiliza el nucleopolihedrovirus de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes ajenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de la α -Gal A puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de la polihedrina) del virus y puesta bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de la polihedrina). La inserción con éxito de la secuencia codificante dará como resultado la inactivación del gen de la polihedrina y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus sin la cubierta de proteínas para la que codifica el gen de la polihedrina). Estos virus recombinantes son después usados para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado. (Por ejemplo, véase Smith *et al.*, 1983, *J. Viol.* 46:584; Smith, patente de Estados Unidos nº 4.215.051).

5.2.2. Identificación de transfectantes o transformantes que expresan el producto α -Gal A

15 Las células hospedantes que contienen la secuencia codificadora de α -Gal A y que expresan el producto génico biológicamente activo, se pueden identificar mediante al menos cuatro métodos generales: (a) hibridación ADN-ADN o ADN-ARN; (b) la presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras"; (c) evaluando el nivel de transcripción según se mide por la expresión de transcritos de ARNm de α -Gal A en la célula hospedante; y (d) detección del producto génico según se mide por inmunoensayo o por su actividad biológica.

20 En el primer método, se puede detectar la presencia de la secuencia codificadora de α -Gal A insertada en el vector de expresión mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN, utilizando sondas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a la secuencia codificadora de α -Gal A, sustancialmente como se muestra en la FIG. 1A-1C, o partes o derivados de la misma.

25 En el segundo método, se puede identificar el sistema vector de expresión recombinante/hospedante y seleccionar basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones génicas "marcadoras" (p.e., actividad timidina-quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpo de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si se inserta la secuencia codificadora de α -Gal A dentro de una secuencia génica marcadora del vector, se pueden identificar los recombinantes que contienen la secuencia codificadora de α -Gal A por la ausencia de la función génica marcadora. Por otra parte, se puede colocar un gen marcador en tándem con la secuencia de α -Gal A, bajo el control del mismo, o diferente, promotor utilizado para controlar la expresión de la secuencia codificadora de α -Gal A. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificadora de α -Gal A.

35 En el tercer método, se puede evaluar la actividad de transcripción para la región codificadora de α -Gal A, mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, se puede aislar ARN y analizar mediante hibridación Northern, utilizando una sonda homóloga a la secuencia codificadora de α -Gal A, o a partes particulares de la misma, sustancialmente como se muestra en la FIG. 1A-1C. Por otra parte, se puede extraer el total de ácidos nucleicos de la célula hospedante y se pueden ensayar para hibridación con dichas sondas.

40 En el cuarto método, la expresión del producto proteico Gal A se puede evaluar inmunológicamente, por ejemplo, mediante hibridaciones Western, inmunoensayos tales como radioinmunoprecipitación, ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas y similares. Sin embargo, el ensayo final del éxito del sistema de expresión, implica la detección del producto del gen α -Gal A biológicamente activo. Cuando la célula hospedante secreta el producto génico, se puede ensayar el medio exento de células, obtenido de la célula hospedante transfectante cultivada, para la actividad α -Gal A. Cuando el producto génico no se secreta, pueden ensayarse lisados celulares para determinar tal actividad. En ambos casos, se pueden utilizar una serie de ensayos para detectar actividad α -Gal A, incluyendo, pero no estando limitados, a: (a) ensayos que utilizan los α -D-galactósidos sintéticos, fluorogénicos o cromogénicos, tales como 4-metilumbeliferil- α -D--galactopiranosido (Desnick *et al.*, 1973, *J. Lab. Clin. Invest.* 81:157); (b) ensayos que utilizan los sustratos naturales marcados, fluorescentes o marcados radiactivamente, tales como una globotriasolilceramida tritiada o pireno-dodecanoil-esfingosina-trihéxosido (Bishop and Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:1307); y (c) ensayos que utilizan X- α -Gal.

5.2.3. Purificación del producto del gen α -Gal A

50 Una vez que se identifica un clon que produce elevados niveles de α -Gal A biológicamente activa, el clon se puede ampliar y utilizar para producir elevadas cantidades de la enzima, la cual se puede purificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero no estando limitados a, purificación de inmunoafinidad, métodos cromatográficos que incluyen cromatografía líquida de alta resolución y similares. Puesto que la enzima es secretada por las células cultivadas, la α -Gal A puede ser rápidamente recuperada del medio de cultivo.

55 Como se demuestra en los ejemplos de trabajo descritos más adelante, la α -Gal A recombinante se purificó del medio bruto por cromatografía de afinidad en α -GalNH₂-C₁₂-Sefarosa, seguido por cromatografía hidrófoba en octil-

Sefarosa y filtración en gel en una columna de Superosa 6 de 100 cm. La enzima recombinante fue esencialmente homogénea después de la etapa de filtración en gel y fue >98% pura a juzgar por SDS-PAGE.

La α -Gal A humana recombinante se purificó hasta homogeneidad del medio de la línea de células CHO, DG5.3, la cual se vio que secretaba la mayor parte de la enzima recombinante. El medio de cultivo de este clon estaba altamente enriquecido en α -Gal A cuando se utilizaba medio exento de suero, constituyendo más del 95% de la proteína extracelular total. Así, la purificación hasta la homogeneidad se pudo llevar a cabo en solamente tres etapas cromatográficas. Se produjo más de medio gramo de enzima en tres meses, y de una parte de ésta se purificaron 280 mg con un rendimiento del 80% utilizando solamente equipamiento a escala de laboratorio. Especialmente, la enzima recombinante tenía plena actividad enzimática con una actividad específica igual a la de la enzima humana previamente purificada (Bishop, *et al.*, 1978, *Biochim. Biophys. Acta.* 525:399; Bishop and Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:1307). La enzima recombinante podía reconocer y escindir de forma efectiva un análogo del substrato natural, la globotriaosilceramida.

Cuando se manipula por ingeniería genética la secuencia codificadora de α -Gal A para que codifique una proteína de fusión que se puede escindir, la purificación de la α -Gal A se puede llevar a cabo fácilmente utilizando técnicas de purificación por afinidad. En los ejemplos de realización descritos más adelante, una secuencia consenso de reconocimiento de escisión de colagenasa se obtuvo mediante ingeniería genética entre el extremo carboxilo de α -Gal A y la proteína A. La proteína de fusión resultante se purificó fácilmente usando una columna de IgG que se unía al resto de la proteína A. La α -Gal A no fusionada se liberó fácilmente de la columna mediante tratamiento con colagenasa.

En particular, se utilizó el método de extensión del solapamiento (Ho, *et al.*, 1989, *Gene* 77: 51; Kadowaki, *et al.*, 1989, *Gene* 76:161), para fusionar el ADNc de α -Gal A de longitud completa al dominio E de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Después de la transfección por electroporación, se incrementó la actividad de α -Gal A en extractos de células COS-1, de 6 a 7 veces. Además, las células transfectadas secretaron cantidades significativas de la proteína de fusión en el medio de cultivo (400 U/ml). La proteína de fusión secretada se purificó rápidamente mediante una única etapa de purificación por afinidad con IgG. La manipulación por ingeniería genética de una secuencia consenso de reconocimiento de escisión por colagenasa entre estos dos polipéptidos, facilitó la escisión de la proteína de fusión de forma que el polipéptido α -Gal A humano purificado se pudo separar fácilmente del dominio de proteína A mediante una segunda etapa de purificación con IgG. El hecho de que la biomolécula artificial de fusión retuviera la actividad de α -Gal resultaba de interés, indicando presumiblemente que el polipéptido enzimático formaba la configuración homodimérica activa, aunque el extremo carboxilo estuviera unido a 56 restos más del dominio de la proteína A. Puesto que las células COS-1 transfectadas con una biomolécula artificial de α -Gal A muestran niveles similares de expresión y distribución entre células y el medio, parece que el dominio de la proteína A no interfiere con, bien sea el plegamiento, o el adecuado procesado de esta enzima lisosomal. Además, la presencia del polipéptido α -Gal A dimerizado no inhibía la unión del dominio de la proteína A a la columna de afinidad con IgG. La inserción de la secuencia de reconocimiento de escisión por colagenasa de cuatro restos entre los polipéptidos α -Gal A y proteína A, permitió la escisión de la proteína de fusión, dejando solamente dos de los restos de colágeno en cada uno de los péptidos.

La facilidad de construcción de ADNc utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, transfección y purificación de la proteína expresada, permite el aislamiento de una pequeña, pero suficiente, cantidad de α -Gal A para la caracterización de las propiedades físicas y cinéticas de la enzima. Utilizando la mutagénesis dirigida de sitio, o secuencias mutantes que se producen de forma natural, este sistema proporciona un método razonable para determinar los efectos de la estructura primaria alterada en la función de la proteína. También se pueden manipular por ingeniería genética las biomoléculas artificiales de fusión con el dominio E de proteína A que precede al extremo amino terminal y que sigue al extremo carboxilo terminal, para evaluar cual será la biomolécula artificial de fusión que interfiera menos, o nada, con la función biológica de la proteína y la capacidad de unir la IgG.

Usando este aspecto de la invención, se puede manipular por ingeniería genética cualquier sitio de escisión o substrato de escisión enzimática, entre la secuencia de α -Gal A y un segundo péptido o proteína que tenga una pareja de unión que se pueda utilizar para purificación, p.e., cualquier antígeno para el que se pueda preparar una columna de inmunoafinidad.

5.2.4. Caracterización de la enzima recombinante

La enzima recombinante purificada producida en los sistemas de expresión en mamíferos descritos en la presente memoria (p.e., el sistema de expresión CHO), tenía valores de peso molecular, pH óptimo, km y punto isoeléctrico que eran esencialmente idénticos a los de la enzima purificada del plasma humano (Bishop, *et al.*, 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 525:39; Bishop and Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:1307). El análisis de los restos de hidratos de carbono en esta enzima reveló la presencia de tres cadenas de oligosacáridos en el polipéptido α -Gal A. Estas cadenas eran una mezcla de tipos complejo, híbrido y de elevado contenido en manosa, según se evidenció por estudios de endoglicosidasa y QAE-Sephadex. Lo más importante, la enzima recombinante también era similar a la forma nativa de plasma de α -Gal A, en que tenía restos de ácido siálico terminales (Bishop & Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:1307). En el ensayo clínico limitado descrito anteriormente, se vio que la forma de plasma de la enzima

era más efectiva en degradar GbOse₃Cer que la forma de bazo. Por consiguiente, la enzima recombinante, o una enzima recombinante modificada, incluyendo, pero no estando limitada a, modificaciones de sus cadenas de hidratos de carbono o secuencia de aminoácidos, puede ser la forma más adecuada para la terapia de sustitución de enzima de la enfermedad de Fabry. De hecho, la incorporación saturable de α -Gal A recombinante por fibroblastos normales y de Fabry se demuestra en los ejemplos en la presente memoria, y se muestra que se inhibe específicamente por manosa-6-fosfato 2 mM.

Además, el sistema de expresión CHO descrito en la presente memoria es muy prometedor para estudios de la biología celular de la biogénesis lisosomal y procesado de glicohidrolasas. La microscopía óptica reveló un citoplasma altamente vacuolado en las células CHO DG5.3, sugiriendo una proliferación de membranas lisosomales y ofreciendo el potencial para análisis de biogénesis lisosomal. Los estudios preliminares han indicado que la enzima recombinante se sintetiza muy rápidamente, abandona el retículo endoplásmico en los 5-10 min. posteriores a su síntesis y se secreta 45-60 min. después. Estas rápidas cinéticas de la biosíntesis de la α -Gal A recombinante permiten interesantes estudios que implican la biosíntesis de la enzima lisosomal y ofrecen una metodología que, hasta la fecha, solamente encuentra rival en los sistemas virales. De hecho, la α -Gal A recombinante se sintetiza tan rápidamente que un solo pulso radiactivo de 3 min. es suficiente para marcar suficiente enzima para estos estudios. La secreción inesperadamente específica de solamente la α -Gal A recombinante sobre-producida y no de otras enzimas lisosomales, parece análoga a la "secreción dependiente de dosis génica", descrita por Rothman, *et al.* (Stevens *et al.*, 1986, J. Cell Biol. 102:1551; Rothman *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3248) y plantea interesantes cuestiones que podrían ser evaluadas en este sistema.

5.2.5. Glicoformas modificadas de α -Gal A para terapia enzimática en la enfermedad de fabry

Experimentos iniciales para evaluar las cinéticas de aclaramiento y distribución en tejidos de la α -Gal A recombinante en ratones revelaron que un 50% fijaba su objetivo en el hígado, distribuyéndose el resto de la enzima a muchos otros tejidos, incluyendo una significativa fijación del objetivo hacia el riñón, corazón y piel. Mientras que esta distribución es similar a la observada previamente para la forma de plasma de la α -Gal A humana en ratones, puede ser adecuado modificar la enzima para una fijación del objetivo en tejidos alterada. Modificaciones de la α -Gal A recombinante para potenciar la fijación del objetivo en tejidos, incluyen una desglicosilación selectiva de los restos de hidratos de carbono complejos y de alto contenido en manosa, unidos covalentemente a la enzima recombinante. En particular, la invención incluye la modificación de células hospedantes que permite la expresión de glicoformas sialiladas y asialiladas de la enzima, ambas de las cuales pueden ser fácilmente purificada (véase Sección 9 más adelante). Por ejemplo, cuando se utilizan células CHO para expresar α -Gal A, las células CHO se pueden cotransfectar con una biomolécula artificial génica de una sialil-transferasa que suple la función perdida a la célula CHO, con el fin de expresar la glicoforma α 2,6-sialilada de α -Gal A.

Como alternativa, la desglicosilación secuencial de varias glicoformas para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry. Se ha demostrado que tales modificaciones son importantes en la fijación efectiva del objetivo de β -glucocerebrosidasa a macrófagos en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (Barton, N- W., *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87:1913). En este caso, se trató secuencialmente la β -glucocerebrosidasa derivada con neuraminidasa, β -galactosidasa y N- β - acetilglucosaminidasa para exponer restos terminales de manosa para su captación por el receptor de manosa de estas células (Stahl, *et al.*, en The Molecular Basis of Lysosomal Disorders, Barranger, J. A. y Brady, R. O. eds., 1984 Academic Press, NY pp. 209-218).

Las modificaciones a la α -Gal A humana recombinante incluidas en el ámbito de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, desglicosilación secuencial mediante neuraminidasa para exponer galactosa terminal; tratamiento de β -galactosidasa para exponer restos de N- β -acetilglucosaminidasa; y tratamiento con N- β -acetilglucosaminidasa para exponer restos de manosa para fijación del objetivo específica y captación por varios tipos celulares. Las glicoformas de α -Gal A recombinante desglicosiladas secuencialmente pueden analizarse determinando las cinéticas de aclaramiento y la distribución en el tejido de cada una de las glicoformas radiomarcadas después de la administración intravenosa en ratones y monos.

La desglicosilación de α -Gal A recombinante puede conseguirse de una serie de maneras. Los métodos generales de tratamiento secuencial por exo-glicosidasas que pueden usarse son esencialmente los descritos previamente (Murray, G. J., 1987, Meth. Enzymol., 149: 25). Por ejemplo, los restos terminales de ácido siálico pueden retirarse por tratamiento con neuraminidasa unida covalentemente a agarosa; por ejemplo la neuraminidasa tipo VI unida a agarosa (SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO) puede utilizarse a 40 U/g para tratar 100 mg de α -Gal A con 8 unidades de neuraminidasa combinada a pH 5,0 durante 4 horas a 37°C. La neuraminidasa combinada puede retirarse por centrifugación. De forma similar, la β -galactosidasa (3 unidades por 100 mg de α -Gal A) purificada de *Streptococcus pneumoniae* puede usarse para retirar restos terminales de galactosa. Finalmente, puede usarse la N- β -acetilglucosaminidasa de canavalia (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO); por ejemplo, pueden mezclarse 3×10^6 unidades con cada alícuota de 100 mg de la α -Gal A recombinante durante cuatro horas a 37°C. En cada etapa, la enzima recombinante puede purificarse rápidamente libre de enzimas desglicosilantes y de hidratos de carbono libres por purificación sobre la columna de afinidad de α -galactosamina-sefarosa.

Para el análisis del destino *in vivo* de las diversas glicoformas, incluyendo las cinéticas de aclaramiento en plasma y

los estudios de distribución en tejidos, se puede marcar el α -Gal A antes de la modificación. Por ejemplo, la α -Gal A recombinante se puede marcar radiactivamente mediante crecimiento en la línea de células CHO DG5.3 en presencia de 50 μ Ci/ml de [³⁵S]-metionina (>1.000 Ci/mmol) durante 24 horas. La enzima marcada radiactivamente secretada se puede purificar del medio recogido por cromatografía de afinidad en α -galactosamina-Sefarosa, como se ha descrito antes. Esencialmente 100% de la proteína marcada radiactivamente, secretada por estas células, es α -Gal A, la cual a continuación se puede utilizar para la generación secuencial de las glicoformas.

5.3. Usos de la α -Gal A recombinante

Los productos purificados obtenidos de acuerdo con la invención pueden ser utilizados de forma ventajosa para terapia de sustitución de enzima en pacientes con el trastorno de almacenamiento lisosomal, enfermedad de Fabry. Por otra parte, los productos purificados obtenidos de acuerdo con la invención se pueden utilizar *in vitro* para modificar α -D--galacto-gliconjugados en una variedad de procesos; *p.e.*, para convertir eritrocitos del grupo sanguíneo B al grupo sanguíneo O; en procesos comerciales que requieren la conversión de azúcares tales como rafinosa a sacarosa o melibiosa a galactosa y glucosa; etc. Éstos se discuten en más detalle en las subsecciones más adelante.

5.3.1 Terapia con la enzima α -Gal A en la enfermedad de Fabry

Entre los errores innatos del metabolismo, los estudios de pacientes con trastornos de almacenamiento lisosomal han proporcionado un entendimiento básico de la biología del aparato lisosomal y sus hidrolasas, su biosíntesis y procesado (Rosenfeld, *et al.*, 1982, J. Cell Biol. 93:135; Lemansky, *et al.*, 1984, J. Biol. Chem. 259:10129), el mecanismo de su transporte a los lisosomas (Neufeld, *et al.*, 1975, Ann. Rev. Biochem. 44:357; Sly *et al.*, 1982, J. Cell Biochem. 18:67; Kornfeld, S., 1986, J. Clin. Invest. 77:1), y sus requerimientos de cofactor (Verheijen, *et al.*, 1985, Eur. J. Biochem. 149:315; d'Azzo, *et al.*, 1982, Eur. J. Biochem. 149:315; Mehl, *et al.*, 1964, Physiol. Chem. 339:260; Conzelman, *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3979). De los más de 30 trastornos de almacenamiento lisosomal, la enfermedad de Fabry es un candidato ideal para la aplicación de las técnicas de ADN recombinante descritas en la presente memoria para evaluar y utilizar diversos métodos terapéuticos en sistemas modelo, así como para correlacionar los efectos de los cambios específicos de sitio en la estructura y función enzimática. La enfermedad no tiene una implicación del sistema nervioso central; así, la barrera sangre/cerebro no representa un obstáculo a la terapia de sustitución de la enzima. La enzima defectuosa, la α -Gal A, es un homodímero (Bishop & Desnick, 1981, J. Bio. Chem. 256: 1307), en contraste con algunas enzimas lisosomales que tienen diferentes subunidades tales como la β -hexosaminidasa A (Mahuran, *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1602); por consiguiente, solamente se debe obtener un único producto génico. El defecto metabólico en fibroblastos cultivados de enfermedad de Fabry ha sido corregido *in vitro* por la adición de enzima exógena en el medio de cultivo (Cline, *et al.*, 1986, ADN 5: 37). También se han identificado variantes atípicas con enfermedad de Fabry, estos varones son clínicamente asintomáticos, con suficiente actividad α -Gal A residual (3 a 10%) para protegerlos de las manifestaciones mórbidas más importantes de la enfermedad (Lemansky, *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262:2062; Clarke, *et al.*, 1971, N. Engl. J. Med. 284: 233; Romeo, *et al.*, 1975, Biochem. Genet. 13: 615; Bishop, *et al.*, 1981, Am. J. Hum. Genet. 71: 217A; Bach *et al.*, 1982, Clin. Genet. 21: 59; y Kobayashi, *et al.*, 1985, J. Neurol. Sci. 67: 179). Finalmente, como se apuntó antes, ensayos limitados en humanos han demostrado la eficacia bioquímica de la sustitución de la enzima para reducir el sustrato en circulación antes de la deposición vascular, así como la ausencia de complicaciones inmunológicas (Brady, *et al.*, 1973, N. Engl. J. Med. 289: 9; Desnick, *et al.*, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5326; Bishop, *et al.*, 1981, Enzyme Therapy XX: en: Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases, Callaghan, J.W. and Lowden, J. A., (eds.), Raven Press, New York, pp 381; Desnick, *et al.*, 1980, Enzyme Therapy XVII: en: Enzyme Therapy in Genetic Disease: 2, Desnick, R.J. (ed.), Alan, R. Liss, Inc., New York, pp 393).

En estos estudios, se administraron intravenosamente las isoformas tanto de plasma, como de bazo, de la enzima α -Gal A. La semivida en circulación de la isoenzima de bazo fue alrededor de 10 minutos, mientras que para la isoenzima de plasma fue aproximadamente 70 minutos. Después de cada dosis de la isoenzima de bazo, la concentración del sustrato en circulación acumulado disminuyó de forma máxima en 15 minutos. En contraste, la inyección de la isoenzima de plasma disminuyó los niveles de sustrato en circulación gradualmente durante 36 – 72 horas. Puesto que la forma secretada de la α -Gal A recombinante parece ser similar a la isoenzima de plasma, la forma secretada de la enzima recombinante podría ser efectiva para la reducción a largo plazo, y el control, de los niveles de sustrato en circulación.

La dosis de las isoenzimas de bazo y plasma parcialmente purificadas administradas en los ensayos clínicos anteriores, fue de 2000 U/kg de peso corporal, o una dosis equivalente para dar 1 μ g/kg de enzima pura. Puesto que esta dosis se comprobó que era efectiva al reducir el nivel de sustrato en circulación, una dosis similar de la enzima recombinante debería tener un efecto similar. Sin embargo, la enzima recombinante se podría administrar en una dosis que variara de 0,1 μ g/kg a alrededor de 10 mg/kg y, preferiblemente de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 2 mg/kg. La capacidad de producir grandes cantidades de la enzima recombinante de acuerdo con esta invención permitirá la evaluación del efecto terapéutico de dosis significativamente superiores.

5.3.2. Usos *in vitro* de la α -Gal A

La α -Gal A es una galactosil-hidrolasa la cual tiene actividad frente a varios oligosacáridos, glicoproteínas, glicopéptidos y glicolípidos con enlaces α -galactosídicos terminales. Así, la enzima se puede utilizar in vitro para modificar estos α -galacto-glicoconjugados. Por ejemplo, la α -Gal A recombinante de la invención se podría utilizar para una diversidad de modificaciones deseables, incluyendo, pero no estando limitadas, a: (a) la conversión de eritrocitos del grupo sanguíneo B a células que expresan el antígeno del grupo sanguíneo O (Harpaz, et al., 1977, Eur. J. Biochem. 77:419-426); y (b) la hidrólisis de estaquiosa a rafinosa, rafinosa al disacárido sacarosa, o la hidrólisis de melibiosa a galactosa y glucosa (Silman, et al., 1980, Biotechnol. Bioeng. 22:533). Dichas hidrolasas tienen aplicación comercial, como es en la degradación de melaza como sustrato para la producción de levaduras (Liljestrom-Suominen, et al., 1988, Appl. Environ. Micro. 54:245-249).

6. Ejemplo: sobreexpresión y secreción específica de α -galactosidasa biológicamente activa en un sistema celular de mamífero

Las subsecciones más abajo describen la producción de grandes cantidades de α -Gal A recombinante humana. Un ADNc de longitud completa que codifica α -Gal A humana se insertó en el vector de expresión p91023 (B) delante del ADNc de la reductasa de hidrofolato amplificable (DHFR). La integridad funcional de la biomolécula artificial de ADNc (p91-AGA) se confirmó mediante expresión transitoria de enzima activa en células COS-1; 650 U/mg (nmol/hora) frente a niveles endógenos de \sim 150 U/mg de actividad de 4-MU- α -D-galactopiranosido. La biomolécula artificial p91-AGA se introdujo por electroporación en células DG44 dhfr CHO. La selección positiva en los medios con falta de nucleósidos dio como resultado el aislamiento de los clones que expresan la enzima activa a niveles que varían entre 300 y 2000 U/mg. Los subclones seleccionados, cultivados en concentraciones crecientes de metotrexato (MTX, 0,02 a 1,3 μ M) para co-amplificar ADNc de DHFR y α -Gal A, expresaron niveles intracelulares de actividad α -Gal A varían entre 5000 y 25000 U/mg. En particular el subclón DG44.5, que expresó niveles altos intracelulares de α -Gal A, secretó más del 80% de la enzima recombinante total producida. A una concentración de MTX de 500 μ M, 107 células secretaron \sim 15000 U/ml de medio de cultivo/día. Es digno de mención que las enzimas lisosomales endógenas de CHO no se secretaron incluyendo β -hexosaminidasa, α -manosidasa, β -galactosidasa y β -glucuronidasa, indicando que la secreción era específica de α -Gal A y no debida a saturación de la vía mediada por receptor de manosa-6-fosfato. Usando un bio-reactor de fibras huecas, se produjeron hasta 5 mg por litro por día de enzima α -Gal A recombinante. La α -Gal A secretada se purificó por cromatografía de afinidad para la caracterización de varias propiedades físicas y cinéticas. La α -Gal A recombinante tuvo un pI, valores de movilidad electroforética y Km que fueron similares a la enzima purificada del plasma humano. Además, estudios de marcación con 32 P revelaron que tanto la forma lisosomal como la secretada se fosforilaron, presumiblemente en sus restos oligosacáridos. Estudios actuales se dirigen a caracterizar propiedades adicionales cinéticas y físicas, los restos oligosacáridos y la estructura cristalina de la enzima recombinante. Además, la disponibilidad de grandes cantidades de enzima activa soluble permitirá la evaluación de la sustitución de enzimas en sistemas animales antes de las pruebas clínicas en hemizigotos con enfermedad de Fabry.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1. Materiales

Endonucleasas de restricción, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, polimerasa T4 y ligasa T4 eran de New England Biolabs; α y γ - 32 [P] dNTP (3000 Ci/mol) y α 35[S]dATP (100 Ci/mol) eran de Amersham. La línea celular COS-1 se compró de ATCC, Rockville, MD. La línea celular CHO DG44 dhfr se ha descrito (Urlaug, et al., 1986. Somat. Cell Genet. 12:555-566).

6.1.2 Construcción del vector de expresión p91-AGA

El plásmido pcDAG126 (Bishop, et al., 1988, en, Lipid Storage Disorders, Salvaryre, R., Douste-Blazy, L. Gatt, S. Eds. Plenum Publishing Coporation, New York, págs. 809 a 822) que contiene el ADNc de α -Gal A de longitud completa se digirió con Bam HI y Pst I y el fragmento inserto de 1,45 kb se purificó mediante electroforesis de gel de agarosa. El ADNc se subclonó cruzadamente después en un plásmido pGEM-4 en los sitios Bam HI y Pst I dando como resultado pGEM-AGA126. Este plásmido se digirió entonces con Hind III, se rellenaron los extremos usando Klenow y se ligó a enlazadores Eco RI. Después de la digestión con Eco RI, el fragmento de 1,45 kb se purificó como se ha indicado anteriormente y se clonó en un sitio de Eco RI del vector de expresión de mamíferos p91023 (B) (Wong et al., 1985, Science 228:810) dando como resultado p91-AGA (Figura 1G).

6.1.3. Cultivo celular, electrotransfección y amplificación génica

Las células COS-1 y DG44 CHO se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 10% de suero de ternero fetal (FCS) y antibióticos; las células DG44 (dhfr) se mantuvieron mediante la adición de hipoxantina 0,05 mM y timidina 0,008 mM a los medios. Después de la transfección, las líneas CHO recombinantes se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FCS dializado en ausencia o presencia de MTX.

Para la electroporación las células se tripsinizaron y centrifugaron a 800 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sedimento se quitó por lavado una vez con DMEM suplementado con suero FCS al 10% y dos veces en

tampón de electroporación helado (sacarosa tamponada con fosfato, sacarosa 272 mM, fosfato de sodio 7 mM, pH 7,4, que contiene $MgCl_2$ 1 mM). Las células se resuspendieron después en sacarosa tamponada con fosfato a entre 0,65 y 1,0 x 10⁷/ml. La suspensión celular (0,8 ml) se situó en una cubeta de 0,4 cm de hueco (Bio-Rad), se añadieron entre 5 y 20 µg de ADN de plásmido y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. La cubeta se colocó en la cámara "Gene Pulser" (Bio-Rad) y se pulsó una vez a 25 µF con 300 V para células COS-1 o 400 V para células CHO DG44 (dhfr), los ajustes optimizados para las líneas celulares respectivas. La cubeta que contenía las células pulsadas se colocó en hielo durante 10 minutos y después las células se retiraron de las cubetas y se colocaron en 15 ml de DMEM suplementado con FCS al 10%.

Para la expresión transitoria, las células COS-1 se recogieron a las 72 horas y se ensayaron inmediatamente. Para la expresión estable, las células DG44 transfectadas se cultivaron durante 48 horas y después se retiraron de la placa de cultivo por tripsinización y se volvieron a sembrar en placa a una relación 1:15 en DMEM suplementado con FCS realizado al 10%. Los medios se reemplazaron cada 4 días. Después de dos semanas de crecimiento, los focos celulares fueron visibles y los clones individuales se aislaron con anillos de clonación. Los clones que expresaron los niveles más altos de α -Gal A se sometieron a una amplificación en masa mediante crecimiento por etapas en concentraciones crecientes de metotrexato (MTX), 0,02, 0,08, 1,3, 20, 40, 80, 250 y 500 µM.

6.1.4. Ensayos de enzima y proteína

Para el ensayo enzimático, las células en una placa de cultivo de 100 mm se quitaron por lavado dos veces con 5 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se rasparon a un tubo con 12 ml usando una varilla con punta de goma. Después de la centrifugación a 800 x g durante 10 minutos, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón $NaPO_4$ 25 mM, pH 6,0, y después se rompieron en el generador de ultrasonidos en copa Branson con tres ráfagas de 15 segundos a una potencia de salida del 70%. El resultante de los ultrasonidos se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se retiró y ensayó inmediatamente. Como alternativa, para una exploración rápida, las células se lavaron como se indica anteriormente y se añadió 1 ml de tampón de lisis (tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5, que contiene NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, y PMSF 0,2 mM) a la placa. Las células lisadas se incubaron a 4°C durante 30 minutos, se recogieron y transfirieron los lisados a un tubo de 1,5 ml, se centrifugó en una microcentrífuga, y después el sobrenadante se retiró para su ensayo.

Las actividades de α -Gal A en los lisados y medios celulares se determinaron usando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido 5 mM (4MU- α -Gal) como se ha descrito previamente (Bishop, et al., 1980, In Enzyme Therapy in Genetic Diseases: 2. Desnick, R.J. (Ed.). Alan R. Liss, Inc. New York, pág. 17). Brevemente, se preparó una solución de reserva de 4MU- α -Gal-5 mM en tampón citrato 0,1 M/fosfato 0,2 M, pH 4,6 en un baño ultrasónico. La mezcla de reacción, que contenía de 10 a 50 µl de extracto celular y 150 µl de la solución de sustrato de reserva, se incubó a 37°C durante de 10 a 30 minutos. Se terminó la reacción con la adición de 2,3 ml de etilendiamina 0,1 M. La fluorescencia se determinó usando un fluorímetro Turner modelo 111. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que hidroliza un nmol de sustrato por hora. Las actividades de α -manosidasa, β -galactosidasa, β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa y fosfatasa ácida se determinaron usando el sustrato de 4-metilumbeliferil adecuado. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de la fluorescamina. (Bohlen, et al., 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155: 213) como se modificó en Bishop et al. (Bishop, et al., 1975, Biochim. Biophys. Acta 524: 109).

6.2. Resultados

6.2.1. Expresión de α -Gal A humana en células cos-1

El ADNc de longitud completa de la α -Gal A humana se clonó en el vector de expresión p91023 (B) (Wong, et al., 1985, Science 228: 810) y la biomolécula artificial, designada p91-AGA, se introdujo en las células COS-1 por electroporación. Los niveles aumentados de la actividad α -Gal A se detectaron a 24, 48 y 72 horas después de la transfección (Figura 2A), indicando la integridad funcional de la biomolécula artificial p91-AGA. A las 72 horas después de la transfección, la actividad α -Gal A aumentó aproximadamente 4 veces, mientras que no se observó aumento de la actividad α -Gal A en células transfectadas con el vector p91023 (B) que contiene el ADNc de la α -Gal A en la orientación anti-sentido, ni en las células que no recibieron ADN. Además los niveles de β -galactosidasa, determinados como un control de enzima lisosomal, no cambiaron (Figura 2B).

6.2.2. Transfección y amplificación de α -Gal A en células DHFR CHO

Los clones recombinantes que expresan de forma estable la α -Gal A humana se obtuvieron por electrotransfección de la biomolécula artificial p91-AGA en las células DG44 dhfr CHO y la amplificación del ADN de vector integrado con selección en concentraciones crecientes de MTX. El crecimiento inicial en medios sin nucleósidos dio como resultado la identificación de más de 100 clones que expresan α -Gal A a niveles que varían entre 100 y 1800 U/mg de proteína (Tabla I). Los clones con el mayor nivel de α -Gal A se cultivaron en presencia de MTX entre 0,02 y 0,08 µM para amplificar el ADN p91-AGA integrado. La Tabla II muestra que los niveles de α -Gal A intracelular en clones amplificados representativos aumentaron de 2 a 6 veces en MTX 0,02 µM y hasta 10 veces cuando se amplificó más en MTX 0,08 µM.

TABLA I

Actividad de α -Galactosidasa A intracelular en células DG 44 (dhfr) CHO* después de la electrotransfección con p91-AGA

Clon	Actividad de α -Gal A (U/mg de proteína)
DG44 Parental:	497
Transfectado:	
4	493
5	1.243
7	108
8	524
9	1.155
11	1.115
20	624
24	1.864
46	720
52	180

* Células crecidas en DMEM suplementado con FCS dializado al 10%

TABLA II

Actividades α -Galactosidasa A intracelulares en células DG 44 (dhfr) CHO transfectadas con p91-AGA después de la amplificación inicial en metotrexato

Clon	α -Gal A (U/mg)
MTX 0,02 μ M:	
5	4.990
9	2.900
11	3.170
46,1	1.230
46,5	4.570
46,12	4.100
MTX 0,08 μ M:	
5,3	23.400
5,7	7.950
5,9	14.680
5,11	3.070
9,1	10.290
9,4	7.950
9,6	3.860

6.2.3 Los clones de expresión de alto nivel secretan α -Gal A humana

5 Entre los clones positivos amplificados en presencia de MTX 0,08 μ M, el clon 5,3 tuvo un el nivel de α -Gal A intracelular más alto (Tabla II) y por tanto se eligió para amplificación posterior. Cuando se cultivó en presencia de MTX 1,3 μ M la actividad α -Gal A en los medios de cultivo del clon DGE5.3 se determinó que era de 2.500 U/ml, o 25

5 veces más grande que el nivel de células DG44 parentales no transfectadas (de 50 a 100 U/ml). El crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de MTX, dio como resultado unas actividades de α -Gal A intracelular y secretada aumentadas (Tabla III). Curiosamente más del 80% del α -Gal A total producido se secretó y el crecimiento en concentraciones crecientes de MTX continuó aumentando el porcentaje de enzima secretada. Adviértase que los datos mostrados en la Tabla III se obtuvieron después de que las células se amplificaran en presencia de la concentración de MTX indicada y después se ensayaron con respecto a la actividad α -Gal A después del crecimiento durante tres semanas en ausencia de MTX, lo que explica sus actividades intracelulares menores que durante el crecimiento bajo presión selectiva (Pallavicini, et al., 1990, Mol. Cell Biol. 10: 401; Kaufman, R.J., 1990, Heth. Enzymol, 185: 537; Kaufman, R.J., 1990, Meth. Enzymol, 185: 487).

TABLA III

Actividades α -Galactosidasa A intracelular y secretada en la línea CHO DG5.3 transfectada con p91-AGA después de la amplificación por etapas en metotrexato. Los datos se obtuvieron en clones después de tres semanas de crecimiento en ausencia de metotrexato.

Concentración de Metotrexato (μ M)	Células CHO	
	(U/mg)	Medios* (U/ml)
DG44 no transfectada:	250	100
P91AGA5-3 transfectada:		
0,00	375	150
0,02	550	265
0,08	600	560
1,3	2.560	2.090
20	6.270	6.530
40	5.795	6.855
80	6.365	8.750
250	5.720	9.945
500	12.560	18.140

* 10^7 células y 10 ml de medios para cada concentración de metotrexato

10 6.2.4. Secreción específica de enzimas lisosomales sobre-expresadas

Para determinar si la secreción de α -Gal A era debida a la saturación de los receptores para fijación de objetivos lisosomales, los medios de cultivo del clon DG5.3 se ensayó con respecto a la presencia de otras enzimas lisosomales. Como se muestra en la Tabla IV, las actividades de siete enzimas lisosomales representativas no aumentaron o fueron menores que las de los medios de la línea celular parental DG44, indicando que la secreción de DG5.3 de α -Gal A era específica.

15 Para determinar si la secreción era específica del clon DG5.3, otro clon, DG9, que no estaba secretando α -Gal A (es decir, la actividad en el medio era de 120 U/ml), se sometió a crecimiento por etapas en concentraciones crecientes de MTX (es decir, MTX de 0,02 a 20 μ M). Después de la amplificación en MTX 20 μ M, el clon DG9 tenía niveles intracelulares y secretados de actividad α -Gal A de 9.400 U/mg y 7.900 U/ml, respectivamente; es decir 89% de la actividad total de α -Gal A producida se secretaba.

TABLA IV

Actividades enzimáticas lisosomales secretadas en medios de cultivo de células transfectadas CHO

Enzima lisosomal	Línea Celular CHO	
	Control DG44	α -Gal A 5-3250
α -galactosidasa A	56	16.900
α -arabinosidasa	2,4	0,9
α -fucosidasa	341	358
β -galactosidasa	35,2	8,9

TABLA IV

Actividades enzimáticas lisosomales secretadas en medios de cultivo de células transfectadas CHO

Enzima lisosomal	Línea Celular CHO	
	Control DG44	α -Gal A 5-3250
β -glucuronidasa	90,0	53,7
β -hexosaminidasa	2.290	2.090
α -manosidasa	147	82,8
Fosfatasa ácida	30,6	6,1

* Media de determinaciones triplicadas en dos experimentos independientes

Puesto que se ha comprobado que el tratamiento de células recombinantes CHO con butirato 50 mM aumenta específicamente la transcripción de los vectores p91023 (B) integrados de manera estable en células CHO (Dorner, et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 20602; Andrews & Adamson, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 5461) se cultivó otro clon transfectado, DG11, que no fue amplificado, en presencia de butirato 5 mM (Tabla V). Los niveles intracelulares de actividad α -Gal A aumentaron de 259 U/mg a 687 U/mg. En particular en presencia de butirato la actividad α -Gal A aumentada se secretó en los medios (103 a 675 U/ml), lo que sugiere que la secreción ocurrió cuando el número de copias del gen aumentó (o, de manera más precisa, el estado estacionario del ARNm de α -Gal A aumentó). La incubación de células inducidas con butirato con M-6-P 5 mM (para prevenir la recapturación de la enzima secretada por el receptor de superficie celular) no dio como resultado un aumento significativo de la cantidad de α -Gal A secretada.

TABLA V

Efecto del butirato en la secreción de α -Gal A en CHO DG11

Clon	Actividad α -Gal A	
	Células (U/mg)	Medios (U/ml)
Control	259	102,6
Butirato	687	675
Butirato + M-6-P 5 mM	604	700

6.2.5 Efecto de la concentración de suero en la secreción

Para determinar si la concentración de suero de los medios de cultivos tuvo un efecto en los niveles de la secreción de α -Gal A recombinante, se cultivó el clon DG5.3 en placas de cultivo de 100 mm a una densidad de 5×10^6 células por placa, en presencia de entre 0% y 10% de FCS dializado durante 5 días. No hubo efecto aparente en la secreción de α -Gal A en células que crecieron con suero entre 2,5% y 10% (Figura 3A-3B). El nivel disminuido de secreción por células DG5.3 cultivadas en suero a 0% y 1% reflejó presumiblemente el bajo crecimiento de estas células.

6.2.6 Producción en biorreactores

Para producir grandes cantidades de α -Gal A recombinante humana, se usaron 108 células del clon DG5.3 que se habían cultivado en presencia de MTX 500 μ M (DG5.3500), para sembrar un biorreactor de fibras huecas. Como se muestra en la FIG. 4, el nivel de α -Gal A producido aumentó hasta aproximadamente 10.000 U/ml por día. Este nivel permaneció constante durante aproximadamente tres meses. Además, la concentración de suero requerida por estas células en el biorreactor disminuyó por etapas hasta 1% sin disminuir en gran medida la producción de α -Gal A (FIG. 4). Un único ciclo de 90 días de este biorreactor dio como resultado > 350 mg de α -Gal A activa recombinante secretada en el medio de cultivo.

6.3. Discusión

Para la α -Gal A humana, las modificaciones post traduccionales parecen ser esenciales en cuanto a estabilidad y actividad, como demuestra el hecho que la enzima no glicosilada expresada en *E. coli* fuera inestable y se degradara rápidamente (Hantzopoulos & Calhoun, 1987, Gene 57: 159). Además la subunidad de α -Gal A, que tiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación, sufre una modificación de carbohidratos y una fosforilación para carga lisosomal (Lemansky, et al., 1987, J. Biol., Chem. 262: 2062). Una caracterización previa de α -Gal A purificada de plasma y

tejido identificó sus distintas composiciones de hidratos de carbono, tendiendo la glicofoma de plasma más residuos de ácido siálico (Bishop, et al., 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 524: 109; Bishop, et al., 1980, *Birth Defects* 16:1; pág. 17; Bishop and Desnick, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 1307). Además, los ensayos clínicos de terapia enzimática revelaron que comparada con la forma derivada de tejido la glicofoma de plasma tenía una retención prolongada en la circulación y era más efectiva en eliminar el sustrato acumulado circulante después de la administración intravenosa a pacientes con enfermedad de Fabry (Desnick, et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5326). Así pues, la expresión amplificada de α -Gal A humana en células CHO se eligió para la expresión de esta enzima recombinante cuya composición nativa incluye restos galactosílicos y de ácido siálico (Ledone, et al., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 186).

Aunque ésta es la primera hidrolasa lisosomal humana que se ha sobre-expresado con éxito, un descubrimiento inesperado fue la secreción de más de 80% de la enzima producida. Esto pudo resultar de diversos mecanismos distintos incluyendo (a) saturación de las vías receptoras de manosa-6-fosfato, (b) una mutación que altera un sitio de glicosilación crítico; (c) el no exponer el resto de manosa-6-fosfato para unión al receptor; o (d) una afinidad inusualmente baja de α -Gal A recombinante para el receptor de manosa-6-fosfato (Reitman & Kornfeld, 1981, *J. Biol. Chem.* 256: 11977; Lang, et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259: 14663; and, Gueze, et al., 1985, *J. Cell. Biol.* 101: 2253; para una revisión véase, Kornfeld & Mellman, 1989, *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 483). Si la secreción de α -Gal A se debiera a la saturación de la vía mediada por receptor, entonces sería de esperar que las otras enzimas lisosomales endógenas también se secretaran. Sin embargo, los niveles de las hidrolasas CHO secretadas permanecieron iguales, o disminuyeron (Tabla IV). Para descartar una posible mutación en el ADNc de α -Gal A introducido durante la construcción e integración del vector (Calcs, et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3015), el ADN del vector integrado se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa. Se secuenciaron completamente 10 subclones en ambos sentidos, y no se identificaron mutaciones. En estudios complementarios de la proteína recombinante purificada (descritos más abajo), se demostró que el resto de manosa-6-fosfato estaba presente en la enzima y que la enzima se unía eficazmente al receptor de manosa-6-fosfato inmovilizado. Además, para demostrar que la secreción de esta proteína en el sistema de expresión utilizado no era dependiente de α -Gal A, se insertó el ADNc que codifica para otra hidrolasa lisosomal, α -N-acetilgalactosaminidasa, en p91023 (B) y se amplificó en células CHO. De forma análoga a las observaciones con α -Gal A, las células que eran altamente expresoras de α -N-acetilgalactosaminidasa (α -GalNac), también secretaban enzima recombinante en el medio.

La presencia de restos manosa-6-fosfato funcionales en la enzima secretada implica que quizás un mecanismo distinto era responsable de su secreción. De hecho, se ha demostrado que muchas otras proteínas secretadas contienen manosa-6-fosfato. Algunas de estas proteínas incluyen proteínas lisosomales mientras que la localización de otras no está clara. Estas proteínas incluyen, proliferina (Lee & Nathans, 1988, *J. Bio. Chem.* 263: 3521) secretada por líneas celulares placentarias proliferativas de ratón; receptor de factor de crecimiento epidérmico en células A-431 (Todderud & Carpenter, 1988, *J. Biol. Chem.* 263: 17893); factor de crecimiento transformante β 1 (Purchio, et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263: 14211); uteroferrina, una fosfatasa ácida que contiene hierro secretada en grandes cantidades por el endometrio uterino de cerdos (Baumbach; et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 81: 2985); y catepsina L (MEP), una cisteína proteasa lisosomal de ratón secretada por los fibroblastos de ratón NIH 3T3 (Sahagian & Gottesman, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 11145). Resulta de interés que la transformación de células NIH 3T3 con virus Kirstein da como resultado un aumento de 25 veces en la síntesis de MEP causando que esta enzima se secrete selectivamente incluso aunque contiene restos de manosa -6-fosfato funcionales (Sahagian & Gottesman, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 11145). Recientemente, el mecanismo para la secreción selectiva de MEP se ha identificado e implica una baja afinidad inherente del MEP por el receptor de manosa-6- fosfato (Dong, et al., 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 7377).

También es notable que la sobre-expresión dirigida por plasma de la carboxipeptidasa Y vacuolar de levaduras en levadura da como resultado más del 50% de la proteína glicosilada normalmente secretada como forma precursora (Stevens, et al., 1996, *J. Cell. Biol.* 102: 1551). Se han observado hallazgos similares para el gen de la proteinasa A de levaduras (Rothman, et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3248). Algunos estudios han sugerido que las glicoproteínas precursoras tienen señales de localización subcelular localizadas dentro del propéptido N-terminal que es reconocido por la vía de secreción, impidiendo de ese modo la carga en la vacuola similar a lisosoma. Es notable que la secreción de estos genes de levadura es dependiente de la dosis génica y que se observa un fenómeno similar para la expresión de células CHO de α -Gal A humana. También es de interés que se secretó la forma precursora de las enzimas de levadura. La forma de plasma de α -Gal A se secreta y sialila más, y otros han demostrado que las enzimas lisosomales en orina humana son las formas precursoras (Oude-Elferink, et al., 1984, *Eur. J. Biochem.* 139: 489). Sin embargo, la secuenciación N-terminal de α -Gal A recombinante expresada por DG44.5 reveló que el extremo amino era idéntico al de la α -Gal A purificada de pulmón humano (Bishop, et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. USA* 83: 7859). Así pues es posible que la expresión de alto nivel de hidrolasas lisosomales humanas de como resultado su secreción debido a la incapacidad de modificar el precursor y/o incapacidad de la maquinaria de localización subcelular para acomodar la carga intracelular de la glicoproteína sobre-expresada. Sin embargo, esto de nuevo daría como resultado la secreción de otras enzimas lisosomales. Puesto que no se detectan otras enzimas lisosomales en los medios de cultivo, es menos probable que la secreción de α -Gal A resulte de la saturación de un componente de la maquinaria de localización subcelular.

Estudios posteriores, dirigidos a determinar diferencias de aminoácidos, carbohidratos u otras (por ejemplo, sulfatación) entre la forma secretada e intracelular de α -Gal A recombinante puede proporcionar conocimientos sobre el mecanismo subyacente a la localización errónea y la secreción selectiva de α -Gal A humana. Además, los esfuerzos para evaluar la generalidad de esta observación deberían incluir la sobre-expresión de otras enzimas lisosomales humanas. El hecho de que grandes cantidades de α -Gal A recombinante humana se secreten por células CHO permite la producción conveniente de la enzima recombinante. La sección 8, más abajo, describe un método para la purificación de la enzima recombinante y la caracterización de sus propiedades físicas y cinéticas incluyendo su captación mediada por receptor por los fibroblastos de Fabry.

7. Ejemplo: purificación, caracterización y procesado de α -galactosidasa A recombinante

Las subsecciones más abajo describen la purificación de α -galactosidasa A humana clonada en el vector de expresión eucariota amplificable, p91023 (B) y sobre-expresada en células de ovario de hámster chino (CHO). La proteína enzimática recombinante, se secretó de manera selectiva en los medios de cultivo y se purificaron más de 200 mg hasta homogeneidad mediante un proceso de cromatografía líquida rápida para proteínas que incluye cromatografía de afinidad en α -galactosilamina-Sefarosa. La enzima secretada purificada era una glicoproteína homodimérica con pesos moleculares nativos y de subunidad de aproximadamente 110 y 57 kDa, respectivamente. La enzima recombinante tenía un pl de 3,7, un pH óptimo de 4,6 y un km de 1,9 mM para 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido. Hidrolizó rápidamente piren-dodecanoil-esfingosil-trihexósido, un análogo marcado con fluorescencia del substrato glicoesfingolípido natural, que fijó su objetivo con apolipoproteína E a los lisosomas de las células CHO que producían enzima. Los estudios de seguimiento por pulsos indicaron que la enzima recombinante asumía su estructura secundaria definida por disulfuro en < 3 minutos, estaba en el Golgi a los 5 minutos donde se volvía resistente a Endo H y se secretaba al medio a los 45-60 minutos. Las formas tanto intracelular como secretada se fosforilaron. La subunidad enzimática secretada era ligeramente más grande que la subunidad intracelular. Sin embargo, después del tratamiento con endoglicosidasa, ambas subunidades co-migraron en SDS-PAGE, indicando diferencias en los restos oligosacáridos de las dos formas. El tratamiento de las enzimas secretadas radiomarcadas con diversas endoglicosidasas reveló la presencia de tres cadenas oligosacáridas unidas por N, dos tipos de alta manosa (sensible a Endo H) y un tipo complejo siendo el segundo resistente a Endo H y F. Los análisis de los oligosacáridos liberados por Endo H revelaron que uno tenía dos residuos fosfato que se unían específicamente a receptores de manosa-6-fosfato inmovilizados mientras que el otro era la estructura híbrida que contenía ácido siálico. Estas propiedades físicas y cinéticas y la presencia de cadenas oligosacáridas de tipo complejo en la enzima secretada recombinante eran similares a las de la enzima nativa purificada de plasma humano. Los fibroblastos de Fabry cultivados recogieron la forma secretada de α -Gal A mediante un proceso saturable que se bloqueaba en presencia de manosa-6-fosfato 2 mM indicando que la unión e internalización se mediaba mediante el receptor de manosa-6-fosfato. Los perfiles de unión de las enzimas secretadas recombinantes y la α -Gal A secretada por fibroblastos humanos tratados con NH_4Cl al receptor inmovilizado eran idénticos. La producción de grandes cantidades de α -Gal A recombinante activa soluble de acuerdo con la invención, que es similar en estructura a la enzima nativa aislada del plasma, permitirá una posterior comparación a las formas de la enzima nativa y la evaluación clínica de estructuración enzimática en la enfermedad de Fabry.

7.1. Materiales y métodos

7.1.1. Materiales

Se obtuvieron endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H), endo- β -N-acetilglucosaminidasa D (Endo D), endoglicosidasa F (Endo F) y el péptido: N-glicosidasa F (PNGasa F) de Boeringer Mannheim, Indianápolis, IN. Se obtuvieron [35S]-metionina (> 1.000 Ci/mmol), D-[2,6-3H]-manosa (60 Ci/mmol), 32P-fósforo (10 mCi/ml) y Amplify de Amersham, Arlington Heights, IL. Se obtuvo Pansorbin de Calbiochem, San Diego, CA. Se obtuvieron los glucósidos 4-MU de Genzyme, Cambridge, MA. Se obtuvieron los adyuvantes de Freund, esfingomielina (de cerebro) y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) de Sigma, St. Louis, MO. Se obtuvieron Sephadex QAE, Sephadex G-25, octil sefarosa y superosa 6 de Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ. Se compraron las placas de sílice TLC (cat. 5626) de EM Science, Gibbstown, NJ. Se obtuvo la línea celular COS-1 del ATCC. Todos los reactivos de cultivo tisular se obtuvieron de Gibco, Grand Island, NY. Se obtuvo el cóctel de centelleo Sinti Verse I de Fisher, Pittsburg, PA. Se obtuvo el receptor inmovilizado de manosa-6-fosfato del Dr. Stuart- Kornfeld, Universidad de Washington, St. Louis, MO. Se obtuvo el piren-dodecanoil-esfingosil-trihexósido (P-C17STH) del Dr. Shimon Gatt, Universidad Hebrea, Israel. Se obtuvo la apolipoproteína E de BTG Inc., Ness-Ziona, Israel.

7.1.2 Cultivo celular

Las células se mantuvieron a 37°C en CO_2 al 5% en la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM) con suero de ternero fetal 10% (FCS) y antibióticos. La línea DG44 se cultivó en DMEM suplementado con HT (hipoxantina, timidina, Sigma) mientras que la línea recombinante CHO DG5.3 recibió DMEM suplementado con FCS dializado al 10%. (Kaufman, et al., 1988, J. Biol. Chem. 263: 6352).

7.1.3. Purificación de α -Gal A recombinante

Los medios de cultivo de CHO recombinante se recogieron (20 l) y concentraron a 500 ml usando un concentrador

de flujo tangencial de módulo Pellicon con un límite de peso molecular de 10.000 daltons (Millipore, MA). El pH del concentrado se ajustó a entre 4,7 y 5,0 con HCl 10 N y se aclaró posteriormente mediante centrifugación a 10.000 x g en una centrífuga refrigerada RC-5 durante 10 minutos.

5 Todas las etapas cromatográficas se automatizaron en un aparato FPLC (Pharmacia) y se realizaron a temperatura ambiente. Aproximadamente 100 ml del concentrado de medios (~20 mg de proteína enzimática α -Gal A) se aplicó a una columna de afinidad de α -Gal A (α -GalNH₂-sefariosa; 2,5 x 8 cm) (Bishop & Desnick, 1981, J. Biol. Chem. 256; 1307) pre-equilibrada con tampón A (citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,7, NaCl 0,15 M). La columna se lavó con tampón A hasta que la concentración de proteína en el eluato volvió al nivel anterior a la aplicación (~200 ml) y se eluyó con 150 ml de tampón B (citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,0, NaCl 0,15 M, galactosa 70,4 mM). El eluato se recogió, 10 concentrado hasta aproximadamente 20 ml usando una célula de ultrafiltración, límite de peso molecular 30.000 daltons, bajo presión de nitrógeno positiva (Amicon). El concentrado se mezcló con un volumen igual de tampón C (Bis-Tris 25 mM, pH 6,0, (NH₄)₂SO₄ 3M), se centrifugó a 10.000 x g y el sedimento que contenía hasta 40% de actividad, se volvió a disolver en tampón A y se mezcló con un volumen igual de tampón C y se centrifugó como se ha descrito previamente. Los sobrenadantes combinados se aplicaron a una columna de octil-sefariosa (1,5 x 18 cm) 15 pre-equilibrada con tampón D (Bis-Tris 25 mM, pH 6,0, (NH₄)₂SO₄ 1,5 M). La columna se lavó como se describe anteriormente hasta que la concentración de proteína eluyente volvió a sus niveles anteriores a la aplicación (~100 ml) y la columna se eluyó con tampón E (fosfato de sodio 5 mM, pH 6,0, etilen glicol 50%). El producto de tres eluciones octil-sefariosa que suman un total de aproximadamente 75 ml, se concentró hasta aproximadamente 2 ml usando un concentrador Amicon. El concentrado se aplicó finalmente a una columna de Superosa 6 (20-40 μ m, Pharmacia, 1,6 x 100 cm) equilibrada en tampón F (fosfato de sodio 25 mM, pH 6,5, NaCl 0,1 M). Se recogió el pico de α -Gal A, ~20 ml, concentrado como se describe anteriormente y almacenado en tampón F a 4°C.

7.1.4. Ensayos de enzima y proteína

Se ensayó el α -Gal A usando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (4-MU- α -Gal) como se describe previamente (Bishop, et al, 1980, In Enzyme Therapy in Genetic Diseases: 2. Desnick, R.J. (Ed.). Alan R. Liss, Inc. 25 New York, pág. 17). Brevemente, una solución de reserva de 4-MU 5 mM se preparó en tampón citrato fosfato 0,1 M, pH 4,6 solubilizado en un baño ultrasónico. Las mezclas de reacción que contenían 10-50 μ l de preparado de enzima o extractos de célula y 150 μ l de sustrato, se incubaron a 37°C durante 10-30 minutos. Las reacciones se terminaron con la adición de 2.33 ml de etilendiamina 0,1 M. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de sustrato/hora.

30 Las digestiones de Endo H, Endo D, Endo F y PNGasa F se realizaron como se describe (Tarentino, et al, 1989, Meth. Cell. Biol, 32: 111). Se diluyeron las muestras a 0,2-0,5% SDS antes de la digestión. Todos los volúmenes de reacción eran 50 μ l. Se añadió una gota de tolueno a cada tubo de reacción para prevenir crecimiento bacteriano. Brevemente, las digestiones de Endo H (5 mU/reacción) se realizaron a 37°C durante una noche en citrato de sodio 5 mM, pH 5,5 y PMSF 0,2 mM. Las digestiones Endo D (10 mU/reacción) se realizaron a 37°C durante una noche en 35 tampón citrato fosfato 0,2 M, pH 6,0 y PMSF 0,2 mM. Las digestiones Endo F (50 mU/reacción) se realizaron durante una noche a 30°C en acetato de sodio 0,17 M, pH 6,0, NP-40 1,6% y PMSF 0,2 mM. Las digestiones de PNGasa F (100 mU/reacción) se llevaron a cabo durante una noche a 30°C en fosfato de potasio 0,17 M, pH 8,6, NP-40 1,6%, PMSF 0,2 mM.

40 La concentración de proteína se determinó mediante el método de la fluorescamina (Bohlen, et al., 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155: 213) como modificaron Bishop et al. (Bishop et al., 1978, Biochim. Biophys. Acta 524: 109).

7.1.5. Ensayo de sustrato natural *in vivo*

Para este ensayo, se mezclaron 30 nmoles de P-C12STH y 70 nmoles de esfingomiélin en una solución cloroformo:metanol (1:1), se evaporaron con nitrógeno y se secaron en un Speed-Vac (Savant). Se resuspendió el 45 sedimento en 2 ml de salino, se le sometió a ultrasonidos usando un generador de ultrasonidos de Microson de Heat Systems Ultrasonics, Inc. durante 3-5 minutos a 40% de potencia de salida y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió la apolipoproteína E (80 μ g) y se incubó la mezcla durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. Los liposomas se añadieron al medio de cultivo de células CHO recombinantes y se incubaron a 37°C en una incubadora de CO₂ durante de 1 a 4 horas. Se retiraron las células de las placas de cultivo mediante tripsinización, se lavaron una vez en DMEM suplementado con suero de ternero fetal 10% y dos veces con 50 salino. El sedimento celular se resuspendió en cloroformo-metanol y se calentó a 60°C durante 10 minutos y se centrifugó a 600 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se secó con nitrógeno y el sedimento se resuspendió en 100 μ l de cloroformo:metanol. Las muestras se aplicaron puntualmente en una placa de cromatografía de capa fina de gel de sílice y se cromatografiaron en cloroformo:metanol:agua (90:10:1) durante 45 minutos seguido de 55 cromatografía en cloroformo:metanol:agua (75:25:4) durante 30 minutos. Los productos se visualizaron bajo luz UV (330 nm), se escindieron de la placa mediante raspado, se resuspendieron en cloroformo:metanol, y se cuantificó su fluorescencia en el espectrofluorímetro de Farrand (excitación 343 nm, emisión 378 nm).

7.1.6. Anticuerpos policlonales

Se inyectó a un conejo blanco de Nueva Zelanda (2 kg) con 150 μ g de α -Gal A de bazo purificada en el adyuvante

completo de Freund preparado como se indica: se añadieron 150 μg de $\alpha\text{-Gal A}$ a 0,5 ml de PBS en una jeringa de vidrio. Usando una jeringa de calibre 21 de acero inoxidable se mezcló la solución PBS/ $\alpha\text{-Gal A}$ con 0,5 ml del adyuvante completo de Freund en una segunda jeringa de vidrio, hasta que se obtuvo una emulsión homogénea. Se inyectó la emulsión en 8 sitios subcutáneos distintos (espalda) y un sitio intramuscular (muslo). Dos meses después de la inyección inicial, se estimuló al conejo mediante 50 μg de $\alpha\text{-Gal A}$ en el adyuvante incompleto de Freund como se describe anteriormente. Se recogió el suero de una vena de la oreja los días 8 y 12 después del estímulo. Se comprobó la titulación usando un ensayo ELISA convencional (Johnstone & Thorpe, 1982, *Immunochemistry in Practice*: Balckwell Scientific Publications, Oxford). Los impulsos subsiguientes se dieron aproximadamente cada dos meses seguidos de un sangrado 10 días después. Un sagrado típico proporcionaba entre 30 y 40 ml de sangre.

5

10 7.1.7. SDS-PAGE y auto-radiografía

La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo bajo condiciones reductoras (cuando fuera apropiado) como describe Laemmli en una plancha de 1,5 mm de grosor que contiene 10% de acrilamida (Laemmli, U.K., 1970, *Nature* 227: 680). Se fijó el gel en 10% de ácido acético y 20% metanol durante 30 minutos y después se empapó en Amplify durante 30 minutos con agitación. Los geles se secaron al vacío durante 90 minutos (Hoffer) y se expusieron a un AR Kodak X Omat durante de 4 a 72 horas.

15

7.1.8. Punto isoeléctrico y determinación de pH óptimo

El punto isoeléctrico se determinó usando QAE sephadex esencialmente como describen Yang y Langer (Yang & Langer, 1987, *Biotechniques* 5: 1138). El pH óptimo se determinó en tampón de fosfato de sodio 25 mM a 37°C.

7.1.9. Cromatografía por afinidad con un receptor de manosa-6-fosfato y cromatografía de QAE Sephadex

20 El receptor de manosa-6-fosfato de 215 kDa (receptor de M-6-P) unido a Affigel-10 estaba en una concentración de 0,4 mg/ml de gel empaquetado. Las muestras, en tampón de enlace (imidazol 50 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM, 0,05% Triton X-100, sodio- β -glicerol fosfato 5 mM, 0,02% azida sódica), se aplicaron a una columna de 1,5 x 0,8 cm con una tasa de flujo de 0,3 ml/minuto. Después de la aplicación de la muestra (5 ml), se lavó la columna con 5 ml de tampón de enlace y se eluyó con un gradiente no lineal de manosa-6-fosfato en tampón de enlace (0-5 mM). Este gradiente exponencial (Dong, et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 4210) se formó mediante un aparato que consiste en dos cámaras de 2,5 cm de diámetro y 1 cm de diámetro. Se recogieron las fracciones (0,5 ml) y se ensayaron alícuotas de 10 μl con respecto a la actividad $\alpha\text{-Gal A}$ usando 4-MU- $\alpha\text{-Gal}$ y para radiactividad usando 10 ml de cóctel de centelleo Sinti Verse I.

25

30 La cromatografía QAE Sephadex en una columna de 3 x 0,8 cm se realizó como se ha descrito (Varki & Kornfeld, 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 2808; Varki & Kornfeld, 1980, *J. Biol. Chem.* 255: 10847). Brevemente, después de la digestión con Endo H se aislaron los oligosacáridos liberados (marcados son [3H]-manosa) y se desalaron en una columna de 18 x 0,8 cm de Sephadex G-25. Se aplicaron las muestras a la columna de QAE Sephadex y se eluyeron con alícuotas sucesivas de 5 ml de Tris 2 mM, pH 8,0 que contiene NaCl 0, 20, 40, 80, 100, 120, 140, 160, 200, 400 y 1000 mM. Los oligosacáridos eluidos de acuerdo con el número de sus cargas negativas; carga 0 a NaCl 0 mM, 1 a NaCl 20 mM, 2 a NaCl 70 mM, 3 a NaCl 100 mM y 4 a NaCl 140 mM.

35

7.1.10. Marcaje de células con [35S]-metionina, [3H]- manosa y [32P]-fósforo

Los cultivos confluentes en placas de 100 mm se lavaron una vez con 5 ml de DMEM sin metionina. Se colocó una alícuota fresca de este medio (5 ml) en cada placa y se incubaron los cultivos en una incubadora a 37°C durante 30 minutos. Se retiró el medio de las placas y se añadió una alícuota nueva de DMEM sin metionina (1 ml), suplementado con FCS dializado al 10% y 50-100 μCi de [35S]-metionina. Se incubaron las células a 37°C durante de 3 a 5 minutos, los medios radiactivos se retiraron y se lavaron dos veces las células con DMEM más FCS. Se siguieron las células para los tiempos indicados en 5 ml de DMEM más FCS que contenían metionina 2 mM. Para el marcaje durante la noche, los cultivos recibieron 5 ml de DMEM sin metionina suplementado con FCS dializado, glutamina, antibióticos, NH₄Cl 10 mM y 200 μCi de [35S]-metionina.

40

45 Para el marcaje con [3H]-manosa, se dejaron crecer los cultivos como se ha indicado anteriormente en DMEM suplementado. Se lavaron las células con 5 ml de DMEM de baja glucosa y se añadió una alícuota nueva de medios. Se añadió [3H]-manosa (250 μCi , secado con nitrógeno y resuspendido en DMEM), y se incubaron las células en una incubadora a 37°C durante 24 horas.

45

50 Para el marcaje con 32P, se cambiaron los cultivos a un DMEM sin fosfato suplementado con FCS 10% dializado. Después de la adición de [32P]-ortofosfato (1 mCi) se incubaron los cultivos en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 24 horas.

50

7.1.11. Lisis celular e inmunoprecipitación

Las células que habían crecido en placas de cultivo de 100 mm se lavaron dos veces con 5 ml de tampón salino fosfato (PBS) y se rasparon a tubos cónicos de 12 ml usando una varilla con punta de goma y 10 ml de PBS. Después de la centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos se resuspendieron las células en 1 ml de NaPO₄ 25

55

mM, pH 6,0 y recibieron 3 ráfagas de 15 segundos en un generador de ultrasonidos de copa de Branson. Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación (10.000 x g durante 15 minutos a 4°C). Como alternativa, se lavaron las células como se describe arriba y se añadió 1 ml de tampón de lisis (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% NP-40, PMSF 0,2 mM) a la placa. La placa de cultivo se incubó a 4°C durante 30 minutos y se transfirieron las células a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Los residuos celulares se retiraron como se ha descrito anteriormente.

Se llevó a cabo la inmunoprecipitación como se ha descrito (Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press págs.18. 42-18.46). Brevemente, se colocaron 0,5 ml de lisado celular o medios de cultivo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de suero de conejo preinmune. La mezcla se incubó a 4°C durante una hora con agitación suave. Se añadieron 50 µl de Pansorbin y se continuó la incubación durante 30 minutos. Se clarificó la mezcla por centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos, se añadieron 100 µl de anticuerpo policlonal anti- α -Gal-A y se continuó la incubación durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Se añadió Pansorbin (100 µl) y se continuó la incubación durante 30 minutos que se ha indicado anteriormente. El complejo terciario antígeno-anticuerpo de células *S. aureus* se recogió por centrifugación como se describe anteriormente. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento sucesivamente en tampón NET (fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% NP-40, 0,25% gelatina) suplementado con NaCl 0,5 M, en tampón NET con 0,1% SDS y en tampón TN (Tris 10 mM, pH 7,5, 0,1% NP-40). La proteína inmunoprecipitada se desnaturizó mediante calor a 100°C durante 5 minutos en presencia de 2% SDS, DTT 100 mM (no se usó el DTT para experimentos que implicaran conformaciones de estructuras secundarias). Las células de *S. aureus* se retiraron por centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

7.2. Resultados

7.2.1. Purificación

La α -Gal A recombinante producida en el biorreactor celular se purificó de medios brutos por cromatografía de afinidad en α -GalNH₂-C12-sefarosa (Bishop & Desnick, 1981, J. Biol., Chem. 256: 1307) seguida de cromatografía hidrofóbica en octil sefarosa y filtración en gel en una columna de Superosa 6 de 100 cm como se ha descrito anteriormente. La Tabla VI muestra una purificación habitual de un lote de 20 mg de α -Gal A recombinante y las actividades específicas de la enzima en cada etapa de purificación. La enzima recombinante era esencialmente homogénea, siguiendo la etapa de filtración del gel, y era > 98% pura tal como se juzgó mediante SDS-PAGE (FIG. 5). Un contaminante menor de la albúmina de suero bovino se eliminó mediante una etapa de filtración de gel adicional en una columna de sefarosa azul (Travis, et al., 1976, Biochem. J, 157: 301) dando como resultado un preparado de enzima que era puro en más de un 99% tal como se juzgó mediante la carga de 20 µg de α -Gal A en SDS-PAGE.

TABLA VI

Purificación por FPLC de α -Gal A recombinante comenzando un ciclo de purificación típico con 20 MG de α -Gal A

Etapa	U x 103	U x 103	Purificación de plegamiento	% de rendimiento
Medios	39.750	5	1	100
α -GalNH ₂ -sefarosa	36.500	680	136	91
Octil sefarosa	31.750	3.400	680	79
Superosa 6	30.800	4.150	830	78

Se demostró que la purificación de α -Gal A recombinante se facilitaría por crecimiento de las células CHO en medios libres de suero mediante marcaje metabólico de la proteína celular total y secretada. En contraste con el resultado visto en la FIG. 5, la α -Gal A radiomarcada era esencialmente la única proteína vista en los medios de la línea de alta expresión, DG5.3 (FIG. 6).

7.2.2. Propiedades fisicocinéticas

Se descubrió que la α -Gal A recombinante tiene un peso molecular de subunidad de ~ 57 kDa basándose en SDS-PAGE (FIG. 5). El Km hacia el sustrato artificial 4-MU- α -D-galactopiranosido fue 1,9 mM (FIG. 7A) y el pH óptimo y punto isoeléctrico fueron 4,6 y 3,7 respectivamente (FIG. 7B Y 7C).

Para determinar si la enzima recombinante reconocía e hidrolizaba su sustrato natural los liposomas que contenían el sustrato de α -Gal A marcado con fluorescencia P-C12STH y apolipoproteína E (para fijación de objetivos en liposomas) se incubaron con células CHO que sobre-expresan α -Gal A (clon DG5.3). Como se muestra en la FIG. 8A-8B, la α -Gal A lisosomal recombinante hidrolizó rápidamente al sustrato a P-C12SDH (el dihexósido). La

5 hidrólisis rápida de P-C12STH indica que la α -Gal A recombinante puede reconocer este análogo de sustrato natural e hidrolizarlo muy eficazmente. Además, puesto que este sustrato tiene fijado como objetivo el lisosoma, la α -Gal A recombinante asociada a célula debe estar fijada correctamente al objetivo de esta localización. Estos resultados indican que la α -Gal A recombinante producida y secretada por células CHO es esencialmente idéntica a la enzima purificada del plasma humano (Tabla VII).

TABLA VII
Comparación de propiedades de la enzima α -GALACTOSIDASA A recombinante purificada de tejido humano

Propiedad	α -Gal A		
	Bazo	Plasma	Recombinante
Subunidad MW, (kDa)	53	57	57
pH óptimo	4,5	4,6	4,6
Punto Isoeléctrico; PI	4,3	3,7	3,7
Km (4-MU- α -D-Gal), mM	2,5	1,9	1,9
Fosforilación (M-6-P)	+	?	+
Hidrólisis del sustrato natural (GL-3)	+	+	+

7.2.3. Procesado y tasa de secreción de α -Gal A recombinante

10 Los polipéptidos incipientes, que atraviesan el retículo endoplásmico asumen conformaciones de estructura secundaria junto con la traducción y poco después se completa su síntesis (Gething, et. al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32:185). La α -Gal A se marcó con [35S]-metionina durante 3 minutos y después se siguió con metionina fría para los
15 tiempos indicados. La α -Gal A inmunoprecipitada se visualizó en SDS-PAGE. Se prepararon las muestras sin DTT para mantener los puentes disulfuro que podrían haberse formada durante el seguimiento, indicativos de una conformación de estructura secundaria. Se preparó un control (+DTT) haciendo hervir una alícuota de la muestra de 60 minutos en presencia de DTT para destruir los puentes disulfuro y la estructura secundaria. A los 0 minutos del seguimiento (después de 3 minutos de marcaje) ya había un cambio en la movilidad de esta enzima lo que indica que los cambios conformacionales ocurren junto con la traducción o poco después de completarse la síntesis (FIG. 9).

20 La llegada del nuevo polipéptido a la red del Golgi se detectó mediante la adquisición de oligosacáridos resistentes a Endo H (Gething, et. al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32:185). La α -Gal A radiomarcada (pulso de 3 minutos) se siguió con metionina no radiactiva y se inmunoprecipitó como se ha descrito anteriormente. Los inmunoprecipitados se trataron después con Endo H y se visualizaron en SDS-PAGE. Entre 2 y 7 minutos de seguimiento, pudo detectarse la primera forma resistente a Endo H de α -Gal A, lo que es indicativo de la llegada de enzima recombinante al Golgi, aproximadamente de 5 a 10 minutos después de su síntesis (FIG. 10). La mayoría de la forma sensible a Endo H se hizo resistente a los 60 minutos del seguimiento.

25 Esta enzima atraviesa la red del Golgi y se secreta a entre 45 y 60 minutos de seguimiento (FIG. 11). El análisis de los medios totales, de células marcadas con [35S]-metionina, reveló que > 95% de las proteínas secretadas por las células CHO recombinantes eran α -Gal A (FIG. 12).

7.2.4. Análisis de restos de hidratos de carbono en α -Gal A recombinante

30 Hay cuatro secuencias consenso de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) en la subunidad de α -Gal predicha por la secuencia de ADNc. El cuarto sitio probablemente no se utiliza puesto que contiene un resto de prolina en la posición X. Se digirió la α -Gal A recombinante con Endo H, Endo F, Endo D y PNGasa F. La digestión con PNGasa F causó un cambio de 7 kDa en la movilidad en SDS-PAGE de la mitad de la α -Gal A (FIG. 13). Este cambio en peso molecular puede atribuirse a la eliminación de 3 restos de hidratos de carbono unidos por N. La digestión de la enzima recombinante con un cóctel de Endo H, Endo F y PNGasa F no dio como resultado ninguna disminución mayor del peso molecular, lo que indica que toda la enzima contiene 3 restos de hidratos de carbono unidos por N.

35 Endo D, una glicosidasa con una especificidad estricta para la rama inferior del Manol-3 del pentasacárido con núcleo de alta manosa (Tarentino, et. al., 1989, Meth. Cell. Biol. 32: 111), no tuvo un efecto en la movilidad de α -Gal A, lo que indica que la enzima recombinante no contiene este tipo de oligosacárido (FIG. 13). Endo H y Endo F juntos dan como resultado un cambio de 4 kDa lo que indica que dos de los tres oligosacáridos de este enzima son del tipo alto manosa (Varki & Kornfeld, 1980, J. Biol. Chem. 225: 10847).

40 Resulta interesante que la α -Gal A intracelular fue completamente sensible a PNGasa F mientras que la mitad de la enzima secretada era parcialmente resistente a PNGasa F (FIG. 14). Puesto que esta resistencia se eliminó

mediante co-tratamiento con Endo H y Endo F (FIG. 13), son necesarios estudios posteriores con Endo H y Endo F separadamente para determinar la naturaleza molecular de la inhibición selectiva de la PNGasa F o de la resistencia de una porción de la enzima secretada recombinante a digestión por PNGasa F.

Habiendo determinado que la enzima recombinante contiene tres oligosacáridos, dos de los cuales son del tipo alta manosa, se investigó el efecto de la inhibición de glicosilación (Furhmann, et al., 1985, Biochim. Biophys. Acta 825: 95). El procesado y la secreción de la α -Gal A recombinante no se ven afectados por la inhibición selectiva del procesado de oligosacáridos. En presencia de desoxinojirimicina (un inhibidor de glucosidasa I y II), desoximanojirimicina (un inhibidor de manosidasa I), y swainsonina (un inhibidor de manosidasa II) las tasas de secreción de α -Gal A permanecen igual que los controles (FIG. 15). Sin embargo, la tunicamicina (un inhibidor de adición de oligosacáridos) inhibe la secreción de α -Gal A en hasta un 80% (FIG. 15). La enzima secretada de cultivos tratados con tunicamicina pudo unirse a una columna de sefarsa Con A, lo que indica que esta enzima está parcialmente glicosilada, probablemente debido a una inhibición incompleta de la glicosilación por tunicamicina. Estos resultados indican que la adición de oligosacáridos, pero no los eventos de procesado ensayados, es necesaria para la maduración y secreción de la enzima recombinante.

7.2.5. Fosforilación

Puesto que la α -Gal A recombinante contenía restos de alta manosa, la enzima recombinante podría contener M-6-P y ser competente para la captación mediada por receptor. Las células del clon DG5.3 se marcaron metabólicamente con [32P]-ortofosfato durante 12 horas y después se inmunoprecipitaron los extractos y medios celulares y se visualizaron en SDS-PAGE. Como se muestra en la FIG. 16, las α -Gal A tanto asociadas a células como secretadas se fosforilaron, presumiblemente en sus restos de hidratos de carbono como sugieren los experimentos in vitro descritos anteriormente.

7.2.6. Análisis de oligosacáridos sensibles a Endo H

Se retiraron los oligosacáridos de alta manosa mediante el tratamiento de α -Gal A marcada con [3H]-manosa inmunoprecipitada con Endo H. Se analizaron estos oligosacáridos mediante cromatografía en QAE Sephadex (Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808; y Varki & Kornfeld, 1980, J. Biol. Chem. 255: 10847). Se detectaron dos formas principales de estos oligosacáridos, una forma con dos cargas negativas y una con cuatro cargas negativas (FIG. 17A). A la carga negativa puede contribuir un resto fosfodiéster (-1), un resto fosfomonoéster (-2) o el ácido siálico (-1). El tratamiento de estos azúcares con HCl diluido no cambió el perfil de ninguno de los picos lo que indica que no hay grupos fosfodiésteres en estos azúcares (FIG. 17B) (Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808). El tratamiento con neuraminidasa causa un cambio del pico -2 dando como resultado dos nuevos picos en las cargas negativas 0 y -1 (FIG. 17C). Por lo tanto, a la carga del pico -2 contribuye el ácido siálico, con bastante probabilidad dos restos. El pico -1 resultante después del tratamiento con neuraminidasa probablemente es una digestión parcial del pico -2 de la enzima. El tratamiento de estos oligosacáridos con fosfatasa alcalina provocó un cambio en el pico -4 de la carga negativa 0 (FIG. 17D). No hubo efecto en el pico -2 lo que indica que a la carga del pico -4 contribuyen dos uniones fosfomonoéster mientras que el pico -2 no contiene ninguna de tales uniones. Así pues es evidente a partir de estos resultados que Endo H libera dos tipos de oligosacáridos de alta manosa de la α -Gal A recombinante, uno que contiene ácido siálico (posiblemente un oligosacárido híbrido) y el otro que contiene dos uniones fosfomonoéster (presumiblemente como manosa-6-fosfato).

Para confirmar más estos hallazgos se cromatografiaron los picos -2 y -4 en una columna receptora de manosa-6-fosfato inmovilizada (FIG. 18). Aunque el pico -4 interactuaba débilmente con el receptor, pudo unirse a la columna y requirió la adición de manosa-6-fosfato para la elución. Se observó una interacción muy débil entre la columna receptora y el pico -2, lo que sugiere que una porción de estos oligosacáridos híbridos pueden contener M-6-P.

La interacción débil de los oligosacáridos de alta manosa con el receptor M-6-P puede explicarse por la ausencia del núcleo proteínico (Varki & Kornfeld, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2808). Las células DG5.3 se marcaron con [35S]-metionina y las secreciones se cromatografiaron en una columna de receptor de manosa-6-fosfato inmovilizado. En particular la enzima recombinante unida fuertemente a la columna se eluyó específicamente por la adición M-6-P 5 mM (FIG. 19).

7.2.7. Interacción de α -Gal A con el receptor de manosa-6-fosfato

Puesto que se ha demostrado que la α -Gal A recombinante contiene restos de manosa-6-fosfato, es importante establecer si esto también es cierto para la α -Gal A humana normal. Las proteínas de CHO se marcaron con [³⁵S]-metionina en presencia de NH₄Cl, para causar secreción cuantitativa de enzimas lisosomales de nueva síntesis (Dean, et al., 1994, Biochem. J. 217: 27). Los medios se recogieron y cromatografiaron en una columna de receptor de manosa-6-fosfato inmovilizado. La columna se eluyó con un gradiente de manosa-6-fosfato como se describe anteriormente. Este protocolo de elución puede separar enzimas lisosomales en ligandos de unión a receptor de alta y baja afinidad (Dong & Sahagian, 1990, J. Biol. Chem. 265: 4210).

La enzima recombinante se co-eluyó con el grueso de las enzimas lisosomales en una concentración de M-6-P indicativa de formas de alta afinidad (FIG. 20A) Se realizó el mismo experimento con secreciones de células MS914

(fibroblastos humanos diploides normales) (FIG. 20B) y células 293 (células del riñón embrionario transformadas por adenovirus humano) (FIG. 20C). Cuando se aplicó el mismo gradiente M-6-P, la α -Gal A humana también se co-eluyó con el grueso de las enzimas lisosomales, demostrando que la enzima recombinante exhibe afinidad al receptor M-6-P similar a la de la enzima humana normal.

5 7.2.8. Captación mediada por receptor de α -Gal A recombinante en fibroblastos de Fabry

Los fibroblastos de Fabry se incubaron con diversas cantidades de la enzima recombinante durante 6 horas (FIG. 21). La captación de enzima era saturable y se inhibió específicamente por la adición de M-6-P 2 mM en los medios de captación, lo que indica que la captación era vía receptor M-6-P de superficie celular.

8. Ejemplo: fusión de α -Gal A-proteína A expresada en células de mamíferos

10 La subsecciones más adelante describen una biomolécula artificial de fusión del ADNc de α -galactosidasa A humana y el dominio E de unión a IgG de la proteína A de estafilococos expresada en células COS-1 y purificada hasta una homogeneidad aparente por cromatografía de afinidad a IgG. La biomolécula artificial de fusión se desarrolló por ingeniería genética usando técnicas de PCR para insertar la secuencia de 16 nucleótidos de reconocimiento de escisión de la colagenasa entre la secuencia de α -Gal A y la secuencia del dominio E de la proteína A. Además el

15 codón de terminación se eliminó del ADNc de α -Gal A y se insertó en el extremo de la secuencia del dominio E. La expresión transitoria de la biomolécula artificial de fusión en células COS-1 dio como resultado un aumento de 6 a 7 veces sobre los niveles endógenos de la actividad de α -Gal A y una secreción significativa hacia el medio (4.000 unidades; nmoles/hora). La proteína de fusión de los medios de cultivo se purificó hasta la homogeneidad en cromatografía de IgG sefarosa. Después del tratamiento con colagenasa, la α -Gal A liberada se separó del péptido

20 de la proteína A mediante cromatografía de IgG. Mediante este método más del 85% de la proteína de fusión α -Gal A se purificó como proteína homodimérica glicosilada activa. Este método debería ser útil para la expresión y purificación rápida de proteínas normales y mutantes. Además esta biomolécula artificial se ha insertado en células CHO DG44 para que puedan producirse y purificarse rápida y eficazmente grandes cantidades de la enzima recombinante secretada.

25 8.1. Materiales y métodos

8.1.1. Materiales

Las endonucleasas de restricción, la Taq polimerasa, la ligasa T4 y los plásmidos pGem se obtuvieron de Promega (Madison, WI). El vector pRIT5 y la IgG-sefarosa se compraron de Pharmacia (Piscataway, NJ). Los kits de secuenciación Sequenase eran de United States Biochemical Corp. (Cleveland, OH). La colagenasa se obtuvo de

30 Sigma (St. Louis, MO). Los oligonucleótidos se sintetizaron usando un sintetizador de ADN modelo 380B de Applied Biosystems.

8.1.2. Cultivo celular y transfecciones

Las células COS-1 se obtuvieron del ATCC (Rockville, MD). Las células se cultivaron con técnicas convencionales en el Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternera fetal al 10% y antibióticos.

35 Las células COS-1 con crecimiento exponencial (5×10^6 células/matraz T75) se separaron del plástico por tripsinización, se recogieron por centrifugación a $3.000 \times g$ y después se lavaron una vez en tampón de electroporación helado (sacarosa tamponada con fosfato: sacarosa 272 mM, fosfato de sodio 7 mM, pH 7,4, que contiene $MgCl_2$ 1 mM). Después de la centrifugación a $3.000 \times g$ las células se resuspendieron en 0,8 ml de tampón de electroporación y se colocaron en una cubeta de electroporación con un hueco de 0,4 cm. Se añadieron de diez a

40 quince μg de ADN de plásmido y las células se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Se colocó la cubeta que contenía las células en un aparato de electroporación Gene Pulser (Bio-Rad) y se pulsaron las células a 350 V, 25 μF . Las células se mantuvieron en hielo durante 10 minutos adicionales y después se colocaron en una placa de cultivo 100 mm que contenía 10 ml de medio de crecimiento.

8.1.3. Pcr, secuenciación de adn y construcciones del vector

45 La biomolécula artificial de fusión se sintetizó usando una técnica de PCR descrita recientemente (Ho, et al., 1989, Gene 77: 51; Kadowaki, et al., 1989, Gene 76: 161). Brevemente, el ADNc de α -Gal A de longitud completa se subclonó en el plásmido pGEM y el plásmido pG6-AGA resultante se usó para amplificación por PCR de la secuencia de α -Gal A con cebadores diseñados para eliminar el codón de terminación, añadir una secuencia consenso de escisión de la colagenasa en el extremo 3' y para incluir una secuencia de reconocimiento de EcoRI en

50 el extremo 5' del ADNc (FIG. 22). El cebador sentido era 5'-CCGAATTCATGCTGTCCGGTCACCGTG-3' y el cebador antisentido era 5'-CGCCGGACCAGCCGGAAGTAAGTCTTTTAAATG-3'. El dominio E de la proteína A (Nilsson, et al., 1985, EMBO J. 4: 1075) se amplificó de forma similar con la secuencia consenso de la colagenasa en el oligonucleótido 5'; los oligonucleótidos sentido y antisentido fueron 5'-CCGGCTGGTCCGGCGCAACACGATGAAGCT-3' y 5'-GGCCGAATTCGGGATCCTTATTTGGAGCTTGAGA-3', respectivamente. Los productos de 1323 nt y 201 nt de las reacciones de PCR de α -Gal A y proteína A se purificaron

55

en gel en un gel de agarosa a 0,8% y se mezclaron para la reacción de PCR de fusión. El cebador sentido de la reacción de α -Gal A y el cebador antisentido de la reacción de proteína A se usaron para la reacción final de fusión. El producto de esta reacción se digirió con Eco RI y se ligó al plásmido digerido con Eco RI pGEM4Z. El dominio E de la proteína A y las confluencias entre el enlazador y α -Gal A y la proteína A se confirmaron mediante el método de secuenciación de terminación de cadena dideoxinucleótida de Sanger (Hanahan & Meselson, 1985, Methods Enzymol. 100: 333). La secuencia de fusión confirmada se digirió después con Eco RI y se subclonó en el vector de expresión eucariota p91023 (B).

8.2. Resultados

8.2.1. Construcción de fusión de α -Gal A – proteína A (AGA-PA)

La FIGURA 22 muestra la estrategia usada para la construcción de la secuencia de fusión de α -Gal A-dominio E de proteína A. El ADNc de longitud completa de α -Gal A (1323 nt) y la secuencia del dominio E de la proteína A (201 nt) se amplificaron por separado y se fusionaron después mediante una segunda amplificación por PCR (FIG. 22) usando el cebador sentido de ADNc de α -Gal A 5' (P1) y el cebador antisentido de la proteína A 3' (P4). Los cebadores se diseñaron para (a) eliminar el codón de terminación TAA de α -Gal A; (b) insertar la secuencia consenso de reconocimiento de escisión de la colagenasa de 16 nucleótidos que codifica Pro Ala Gly Pro entre la secuencia de ADNc de α -Gal A y de la proteína A; y (c) introduce un codón de terminación TAA en el extremo 3' del dominio E de la proteína A. La integridad de esta biomolécula artificial se confirmó mediante la secuenciación del dominio de la proteína A, el enlazador y el 3' del ADNc de α -Gal A (FIG. 23).

8.2.2. La expresión de pAGA-PA en células COS-1

Setenta y dos horas después de la transfección con la biomolécula artificial pAGA-PA se detectaron niveles máximos de actividad 4MU α -Gal A en extractos celulares y en los medios de cultivo usados (Tabla VIII).

TABLA VIII

Expresión transitoria de la biomolécula artificial AGA-PA en células COS-1. Después de la transfección se observó un aumento de 7 veces la actividad endógena de α -Gal A. Además se observó un aumento de la α -Gal A en los medios de cultivo

CÉLULAS COS-1	Actividad de α -Gal A*	
	CÉLULAS (U/mg)	MEDIOS (U/ml)
Control	210	0
Transfectado	1.300	400

* Ensayado usando 4MU- α -Gal como sustrato

Comparada con la actividad de α -Gal A endógena en células COS-1 de 210 U/mg, las células transfectadas expresaron 1300 U/mg. No se detectó actividad α -Gal A en el medio de cultivo usado de células COS-1 no infectadas mientras que 72 horas después de la transfección se secretaron 400 unidades de actividad a los medios.

8.2.3. Purificación por afinidad de α -Gal A

El medio usado de una única placa de 100 mm de células COS-1 se recogió 72 horas después de la transfección y se aplicó a una columna de sefarosa IgG. A través de la columna pasó una actividad mínima de α -Gal A durante la aplicación de la muestra (flujo continuo), o durante el lavado con tampón (Tabla IX). Sin embargo, más del 95% de la proteína de fusión de α -Gal A unida se eluyó mediante la adición de ácido acético 0,5 M (tampón de elución).

TABLA IX

La cromatografía de sefarosa IgG del producto de fusión de α -Gal A-proteína A de los medios de cultivo de células COS-1 transfectadas.

<u>Etapas de purificación</u>	<u>Actividad α-Gal A* (U/ml)</u>
Medio	4.400
Flujo continuo	10
Lavado con tampón	0
Elución**	4.200

TABLA IX

La cromatografía de sefarosa IgG del producto de fusión de α -Gal A-proteína A de los medios de cultivo de células COS-1 transfectadas.

* Se aplicaron diez ml de medio de cultivo a la columna, se lavó y se eluyó como se describe en "Métodos". La actividad α -Gal A se ensayó usando 4MU- α -Gal como sustrato.

** HAc 0,5 M, pH 3,4

8.2.4. Liberación del dominio de la proteína A de la proteína de fusión AGA-PA.

La proteína de fusión purificada por afinidad se trató con colagenasa durante 1 hora y los productos de reacción se cromatografiaron otra vez en la columna de afinidad con IgG (Tabla X). El dominio E de la proteína A se unió fácilmente a la columna con IgG, mientras que la α -Gal A humana se eluyó en el flujo continuo. Casi 90% de la actividad aplicada se eluyó. Basándose en la actividad específica de la enzima purificada se estimó que este procedimiento dio como resultado 90% de enzima pura.

TABLA X

Tratamiento de fusión de α -Gal A-proteína con colagenasa. Tras el tratamiento la unión a la columna con IgG disminuyó de un 69% a un 11%.

Etapa	% de actividad α -Gal A recuperada*	
	Colagenasa**	
	-	+
Flujo continuo	31	89
Elución	69	11

* Ensayada usando 4MU- α -Gal como sustrato; se aplicaron un total de 4.200 unidades de actividad α -Gal A.

** Tratamiento con colagenasa durante 1 hora a 25°C.

9. Ejemplo: modificación *in vivo* de la glicosilación de la α -Gal A humana recombinante por α 2,6-sialiltransferasa

El ejemplo que se presenta aquí describe un método por el que la enzima α -Gal A humana recombinante se produce en una forma que se parece más estrechamente a la glicofoma de plasma nativa de la enzima. Específicamente, la α -Gal A humana se produce en líneas de células CHO que se han manipulado por ingeniería genética para que contengan un gen α 2,6-sialiltransferasa, de forma que la proteína α -Gal A producida en estas líneas celulares está sialilada. Los resultados que se presentan más adelante demuestran que la enzima α -Gal A biológicamente activa producida utilizando dichas líneas celulares, presenta una distribución en tejidos más amplia, lo cual puede potenciar el valor terapéutico de esta α -Gal A recombinante.

9.1. Materiales y métodos

9.1.1. Construcción del vector de expresión de α 2,6-sialiltransferasa, pst26

Se subclonó el ADNc de rata de 1,6 kb (ST3) que codifica la secuencia de aminoácidos completa de la β -galactósido α 2,6-sialiltransferasa (Gal α 2,6ST; Weinstein *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262: 17735), en el sitio Bam HI del vector de expresión en mamíferos pRLDN, un regalo de Smith, Kline and French Laboratories, dando por resultado el vector denominado pST26. Esta biomolécula artificial se introdujo por electroporación en la línea de células CHO DG5.3-1000Mx, un sobre-expresor de α -galactosidasa A. Se seleccionaron clones por crecimiento en medio que contenía 500 μ g/ml de G418 para seleccionar para la expresión del gen neo de pST26. Los clones positivos se aislaron individualmente utilizando anillos de clonación y a continuación se analizó cada uno para expresión de la α -galactosidasa A humana recombinante secretada total. Además, se determinó el porcentaje de la α -galactosidasa A recombinante secretada que contenía restos de α 2,6-ácido siálico, por cromatografía con aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) en una columna de SNA-Sefarosa, según describen Lee *et al.*, (1989, J. Biol. Chem. 264:13848-13855).

9.1.2 Microscopía de fluorescencia con SNA-lectina

Para la microscopía de fluorescencia, se crecieron clones DG5.3-1000Mx-ST26 positivos en portas de vidrio de 12 mm, y a continuación se tiñeron con SNA marcada con isotiocinato de fluoresceína (FITC), como se ha descrito previamente (Lee *et al.*, 1989, J. Biol. Chem. 264:13848-13855). Brevemente, las células se fijaron con una solución recién preparada de para-formaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,1% en solución salina tamponada con fosfatos

(PBS), pH 7,0, durante 1 hora a 23°C y posteriormente se bloquearon con NH₄Cl 50 mM en PBS durante 30 min a 23°C. Las células se incubaron con FITC-SNA en una concentración de 25 mg/ml en PBS durante 30 min a 23°C. Después de lavar en PBS, los portas se montaron en alcohol polivinílico de vinol 205 al 15%, glicerol al 33%, azida sódica al 0,1% en Tris 100 mM, pH 8,5. Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Photomat III Zeiss, y se fotografiaron utilizando una película de color Gold Kodak de 25 ASA.

9.1.3. Purificación de α -Gal humana marcada radiactivamente con y sin restos de α 2,6-acido siálico

Se crecieron células DG5.3-1000Mx parentales y células DG5.3-ST26.1 modificadas en botellas giratorias de 1 litro (~ 5 x 10⁸ células) con 125 ml de DMEM, que contenía suero de ternera fetal dializado al 10% (GIBCO, Grand Island, NY) y 500 μ Ci de [³⁵S]-metionina. El medio radiactivo se cambió diariamente durante tres días, y se recogió el medio usado de cada línea, se agrupó y se concentró utilizando un concentrador celular agitado (Amicon, Beverly, MA). Aproximadamente 2 mg (4x10⁶ U) de enzima recombinante secretada de las líneas celulares DG5.3-1000Mx y DG5.31000Mx-ST26.1, respectivamente, se purificaron individualmente hasta una actividad específica de 100 cpm/U de enzima. Se trataron individualmente las preparaciones de α -galactosidasa A recombinante, secretada, marcada radiactivamente, purificada (0,5 mg cada una), con 5 unidades de fosfatasa ácida (Sigma) y las formas desfosforiladas también se utilizaron para inyecciones intravenosas.

9.1.4. Distribución en tejidos y semivida *in vivo* de la α -Gal A recombinante

Para las determinaciones de semivida en plasma, se inyectó cada forma de α -Gal A marcada radiactivamente en la vena de la cola de dos ratones hembras CDI. Cada animal se sangró a través del plexo del seno, a intervalos de tiempo durante un periodo de 10-20 minutos. Se centrifugaron muestras de sangre en una centrífuga Microhematocrit IEC y se añadieron 50 μ l de plasma a un líquido de centelleo acuoso (AquaSol, NEN, Boston, MA) para conteo. Para evaluar la distribución en tejido de las diferentes formas enzimáticas, se sacrificaron dos ratones para cada enzima por decapitación 4 horas después de la inyección de enzima, se separaron los tejidos seleccionados, y se determinó la radiactividad en varios tejidos y se expresó por gramo de peso fresco de tejido. Cada valor es la media de dos experimentos independientes.

9.2. Resultados

9.2.1 Introducción de pST26 en células CHO DG5.3-1000Mx y demostración de actividad α 2,6-sialiltransferasa en clones seleccionados para G418

Después de la electroporación del plásmido pST26 en células CHO DG5.3-1000Mx, las células transformadas se seleccionaron las que eran resistentes al antibiótico G418. Del conjunto de células resistentes, se aislaron 10 clones individuales y se ampliaron para más estudios. Estos clones se denominaron DG5.3-1000Mx-ST26.1 a ST26.10. Como se puso en evidencia por la presencia de actividad α 2,6-sialiltransferasa en estas células, cada línea celular se tiñó con FITC-SNA y a continuación se examinó por microscopía de fluorescencia y contraste de fase. Las diez líneas celulares DG5.3-1000Mx-ST26 se tiñeron positivamente por la lecitina fluorescente, indicando que las diversas glicoproteínas de membrana celular servían como aceptores para la α 2,6-sialiltransferasa expresada. En contraste, la FITC-lecitina no teñía las células DG5.3-1000Mx parentales.

9.2.2. Caracterización de α -Gal A α 2,6-sialilada recombinante humana secretada

Se crecieron cada una de las diez líneas celulares DG5.3-1000Mx-ST26 y las células DG5.3-1000Mx parentales en placas de 100 mm en la misma densidad celular. Se determinó la cantidad de actividad α -Gal A humana secretada por mg de proteína de células cultivadas totales para cada línea celular. Las líneas DG5.3-1000Mx-ST26 secretaban del 28 al 100% de la α -Gal A secretada por la línea celular parental (16.000 U/mg proteína, Tabla XI).

Para determinar el porcentaje de la α -Gal A humana recombinante secretada que contenía restos de α 2,6-ácido siálico, la enzima secretada se cromatografió en la columna con SNA inmovilizada, y la enzima unida se eluyó con lactosa 0,4 M. Como se muestra en la Tabla XI, los clones individuales tenían de 55 a 100% de la actividad enzimática aplicada que estaba específicamente unida y se eluía de la columna de lecitina. Especialmente, el clon DG5.3-1000Mx-ST.1 producía la mayor cantidad de α -Gal A recombinante, esencialmente toda la forma enzimática estaba sialilada y se unía a la columna con SNA inmovilizada. En contraste, la α -Gal A recombinante secretada por las células DG5.3-1000Mx parentales tenían poca, si acaso, unión a la lecitina específica de α 2,6- ácido siálico (Tabla XI).

TABLA XI

Líneas celulares CHO DG5.3-1000Mx-ST26 que secretan α -Galactosidasa A humana α 2,6-sialilada

Clon/Subclon	Porcentaje de α -Gal A Secretada unida a Licitina-SNA	Secreción de α -Gal A (% DG5.3-1000Mx*)
--------------	--	--

TABLA XI

Líneas celulares CHO DG5.3-1000Mx-ST26 que secretan α -Galactosidasa A humana α 2,6-sialilada

Clon/Subclon	Porcentaje de α -Gal A Secretada unida a Lecitina-SNA	Secreción de α -Gal A (% DG5.3-1000Mx*)
DG5.3-1000MX	5	100
DG5.3-1000MX-ST26		
Subclones:		
1	100	100
2	99	76
3	93	72
4	79	70
5	74	64
6	73	85
7	72	85
8	55	84
9	51	81
10	28	79

* La actividad se expresa como unidades por mg de proteína celular; la línea DG5.3-1000Mx secretó ~ 16.000 U/mg.

9.2.3. Semivida en plasma y distribución en tejidos de α -Gal A α 2,6-sialilada humana en ratones

Para determinar si el aclaramiento *in vivo* del la α -Gal A α 2,6-sialilada humana recombinante era diferente del de la enzima no sialilada en α 2,6, se inyectó cada forma a ratones y se determinó su semivida en circulación. Como se muestra en la Figura 24A, la presencia de restos de ácido α 2,6-siálico incrementaba la semivida de la enzima en circulación de 14 a casi 30 minutos. Además, el tratamiento con fosfatasa ácida de las enzimas recombinantes α 2,6-sialiladas y no sialiladas en α 2,6, incrementaba la semivida en plasma *in vivo* de la enzima no sialilada en α 2,6 ($T_{1/2}$ de 14 a 24 minutos), mientras que la enzima α 2,6-sialilada tratada con fosfatasa permanecía igual en alrededor de 28 minutos. (Fig. 24B).

Como se muestra en la Figura 25, la presencia o ausencia de restos de α 2,6- ácido siálico y/o restos de fosfato, en las formas de α -Gal A humana recombinante secretadas, tenía un marcado efecto en sus respectivas distribuciones en tejido después de la administración intravenosa a ratones. Se recuperaba un porcentaje superior del total de α -Gal A α 2,6-sialilada inyectada, en pulmones, riñón y corazón, en comparación con la enzima no sialilada en α 2,6; en contraste, se recuperaba menos de la enzima α 2,6-sialilada en el bazo. De forma interesante, cuando la enzima α 2,6-sialilada se trataba con fosfatasa ácida, la enzima modificada se redistribuía en el hígado y bazo, presumiblemente hacia sus células del retículo endotelial (Fig 3). El tratamiento con fosfatasa ácida de la enzima no sialilada en α 2,6, resultaba en la recuperación de significativamente más enzima que su forma no tratada con fosfatasa, en los pulmones y corazón, mientras que se recuperaba menos en el riñón (Fig 25).

10. Ejemplo: la sobre-expresión de proteínas humanas lisosomales da como resultado su agregación intracelular, cristalización en lisosomas y secreción selectiva

El ejemplo presentado aquí describe un método, que es una característica inherente de la invención y se advirtió por primera vez mientras se sobre-expresaba α -Gal A, mediante el cual ciertas proteínas que normalmente están dirigidas intracelularmente pueden expresarse de forma recombinante en una forma secretada. Usando varias enzimas lisosomales recombinantes, los resultados demuestran que la sobre-expresión de tales proteínas en células CHO conduce presumiblemente a agregación, lo que, a su vez, causa que se secrete la proteína, en lugar de que se dirija a vesículas intracelulares, en este caso, lisosomas, a las que normalmente sería enviada. Esta sorprendente característica de secreción facilita la purificación fácil de la proteína recombinante producida.

10.1 Materiales y métodos

10.1.1. Construcción de plásmidos para sobreproducción de enzima lisosomal

La construcción de la biomolécula artificial de expresión de α -Gal A, p91-AGA, se ha descrito anteriormente (sección

6.1.2). Se han descrito las biomoléculas artificiales de expresión análogas para α -N-acetilgalactosaminidasa humana (designada p91-AGB) y la esfingomielinasa ácida (designada p91-ASM) y la expresión transitoria respectiva de cada una en células COS-1 (Wang *et al.*, 1990, J Biol. Chem. 265: 21859-21866; Schuchman *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266: 8535-8539).

5 10.1.2. Cultivo celular, electrotransfección, y amplificación génica

Las células CHO se cultivaron y mantuvieron como se describe anteriormente, en la sección 6.1.3. Análogamente, se realizó electroporación como se describe anteriormente, en la sección 6.1.3.

10 La estimulación por butirato de las células CHO que expresan α -Gal A se realizó como se ha descrito anteriormente (Dorner *et al.*, 1989 J. Biol. Chem. 264: 20602-20607). Brevemente, las células se sembraron en placas de 100 mm y se permitió que crecieran en 10 ml de DMEM suplementado con 10% dFCS durante 2 días. Se retiraron los medios y se reemplazaron con 10 ml de DMEM suplementado con 10% dFCS que contenía butirato de sodio 5 mM. Las células se incubaron durante 16 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ y después se recogieron las células y los medios de cultivo y se determinó la actividad de α -Gal A.

10.1.3. Estudios ultraestructurales y de inmunomarcaje

15 Las células DG5.3-1000Mx se cultivaron hasta la confluencia en placas de 100 mm. Después de la tripsinización (0,25% tripsina, EDTA), se lavaron dos veces en tampón fosfato salino (PBS) y se precipitaron a 1.500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se fijaron las células durante 1 hora con 3% glutaraldehído en PBS, seguido de fijación en 1% OSO₄ tamponado con PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se deshidrataron las muestras con etapas escalonadas de etanol, se infiltraron con óxido de propileno y se embebieron en Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Se cortaron secciones de 1 μ m de áreas representativas. Las secciones ultrafinas se prepararon y tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y después se observaron con un microscopio electrónico (JEM 100 CX, Jeol. USA, Peabody, MA).

25 Para inmunodetección, se prepararon las secciones como se describe anteriormente, y después de embeberlas, se montaron en rejillas de níquel recubiertas de Formvar (Formvar Scientific, Marietta, OH), se incubaron con suero de cabra en PBS durante 30 minutos a 37°C para bloquear uniones no específicas, se lavaron seis veces con PBS y después se incubaron con anticuerpos purificados anti α -Gal A de conejo durante 1 hora. Las secciones se lavaron extensivamente como se describe anteriormente y después se incubaron con partículas de oro de 10 nm combinadas con proteína A (Amersham Corp., Arlington, IL) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar con PBS, se fijaron las secciones con 3% glutaraldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo con PBS y después se examinaron bajo el microscopio electrónico.

10.1.4. SDS-PAGE y autorradiografía

35 La electroforesis en gel PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras como se describe en Laemmli (1970 Nature (London) 277: 680-685) en geles en planchas de 1,5 mm de grosor que contienen 10% acrilamida. El gel se fijó en 10% ácido acético y 20% metanol durante 30 minutos y después se empaparon en Amplify (Amersham Corp.) durante 30 minutos con agitación. Los geles se secaron en vacío durante 90 minutos (Hoffer Scientific Instruments, San Francisco, CA) y después se autorradiografiaron con película AR Kodak X Omat AR (Eastman Kodak Co.) durante de 4 a 24 horas.

10.1.5. Estudios *in vitro* de agregación de α -Gal A

40 Se investigó la posible formación de agregados insolubles de α -Gal A a diversas concentraciones de enzima y de ión hidrógeno. Usando una solución de reserva de α -Gal A secretada, purificada (16 mg/ml en tampón Tris 10 mM, pH 7,0), se colocaron las alícuotas adecuadas en tubos de vidrio borosilicato y se llevaron los volúmenes hasta 200 μ l con agua destilada para que la adición de 100 μ l del tampón adecuado (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 0,5 M, a pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0), las concentraciones finales de α -Gal A (0,1-10 mg/ml) se alcanzarían a valores específicos de pH. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, la turbidez de cada solución se determinó midiendo la DO a 650 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 1201, Milton Roy Co., Rochester, NY) usando una cubeta de vía de 1 cm. Como control, se mezcló 1 mg/ml de α -Gal A secretada, purificada, con concentraciones crecientes de BSA (0,1-10 mg/ml) y se determinó la turbidez de cada solución. Se realizaron experimentos similares con soluciones de α -Gal A (10mg/ml) y BSA (2 mg/ml), a pH decrecientes (de pH 7,0 a 5,0). Después de la incubación y la centrifugación como se describe anteriormente, se sometieron los sobrenadantes y los sedimentos a SDS-PAGE.

10.1.6. Ensayos de enzima y proteína

55 Las actividades de α -Gal A en los lisados y medios celulares se determinaron usando 4-metilumbeliferil- α -D—galactopiranosido (4MU- α -Gal) 5 mM (Genzyme Corp., Cambridge, MA) como se describe anteriormente (Bishop y Desnick, 1981 J. Biol. Chem. 256: 1307-1316). Brevemente, se preparó una solución de reserva de 4MU- α -Gal 5 mM en tampón citrato 0,1 M/fosfato 0,2 M, pH 4,6, en un baño ultrasónico. La mezcla de reacción, que contiene 10-50 μ l

de extracto celular y 150 μ l de la solución de reserva de sustrato, se incubó a 37°C durante de 10 a 30 minutos. La reacción se terminó con la adición de 2,3 ml de etilendiamina 0,1 M. La fluorescencia se determinó usando un fluorímetro Ratio-2 System (Optical Technology Devices, Elmsford, NY). 1U de actividad es la cantidad de enzima que hidrolizó un nmol de sustrato por hora. Las actividades de α -manosidasa, β -galactosidasa, β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa, fosfatasa ácida y α -N-acetilgalactosaminidasa se midieron usando el sustrato 4-metilumbeliferil adecuado. La actividad de la esfingomielinasa ácida se determinó de acuerdo con Gal *et al.* (1975, N. Eng. J. Med. 293: 632-636). Las concentraciones de proteína se cuantificaron mediante el método de la fluorescamina (Bolen *et al.*, 1973, Arch. Biochem. Biophys. 155: 213-220) como se modificó en Bishop *et al.* (1978, Biochem. Biophys. Acta 524: 109-120).

10.2. Resultados

10.2.1. Resultados de sobre-expresión en estructuras cristalinas que contienen α -Gal A humana en vesículas limitadas por membrana

El examen ultraestructural de las células DG5.3-1000Mx amplificadas de forma estable reveló numerosos cuerpos cristalinos de 0,25 a 1,5 μ m que se habían ordenado en redes cristalinas triangulares en vesículas limitadas por membrana por todo el citoplasma (FIG. 26A y 26B). La repetición dentro de estas estructuras cristalinas era de aproximadamente 20 nm. Estas estructuras eran particularmente abundantes en lisosomas (FIG. 28A) y en vesículas que parecían dilatarse TGN (FIG. 28B) (Hand y Oliver, 1984, J. Histochem. Cytochem. 42: 403-442; Griffith y Simons, 1986, Science 234: 438-443; McCracken, 1991, en Intracellular Trafficking of Proteins, Steer and Hanover, eds., Cambridge University Press, New York pp. 461-485). Es digno de mención que las estructuras normales del Golgi no se observaron en estas células, mientras que los complejos de Golgi se identificaron fácilmente en las células DG44 parentales (FIG. 26E, inserción). Cuando las secciones fijadas de osmio-glutaraldehído de las células DG5.3-1000Mx se incubaron con anticuerpos de conejo anti α -Gal A humana purificados por afinidad y después con oro combinado con proteína A, estas estructuras cristalinas se tiñeron específicamente mediante partículas de oro (FIG. 26C y 26D). El hecho de que las estructuras cristalinas estaban marcadas con inmuno-oro, incluso aunque las secciones se fijaron en osmio-glutaraldehído, sugiere que estas estructuras se componían principalmente, si no exclusivamente, de la enzima humana.

Para determinar si las estructuras cristalinas estaban presentes en los clones que expresan niveles menores de α -Gal A, se cultivaron los clones DG5.3-0Mx, -1,3Mx, -250Mx y -1000Mx hasta la confluencia y se examinaron mediante microscopía electrónica. Aunque el TGN se dilataba de forma creciente con la expresión creciente de α -Gal A, sólo el clon DG5.3-1000Mx contenía conjuntos cristalinos en lisosomas. De forma similar, el clon DG5.3-1,3Mx se estimuló con butirato de sodio 5mM durante 18 horas para aumentar la transcripción del vector integrado que contiene el ADNc de la α -Gal A y después se examinó ultraestructuralmente. Comparado con el clon no tratado, el tratamiento con butirato dio como resultado la presencia de orgánulos dilatados que incluían muchas estructuras unidas a membrana que contenían material denso. Estos resultados indican que la formación de cristal era dependiente de la concentración de α -Gal A. Además para evaluar si la formación de cristal era específica de α -Gal A, se examinó el clon AGB14.8-1000 que sobre-expresa α -N-acetilgalactosaminidasa. No se observaron conjuntos cristalinos, pero se vieron varias estructuras dilatadas similares a las del clon DG5.3-1,3Mx, lo que sugiere que la expresión de la α -N-acetilgalactosaminidasa recombinante no había alcanzado el nivel crítico necesario para la formación de cristal.

10.2.2. Agregado de α -Gal A y α -N-acetilgalactosaminidasa a alta concentración y bajo pH

Puesto que era concebible que la sobre-expresión de α -Gal A diera como resultado la formación de agregados solubles y de partículas que no se unieron o se unieron ineficazmente mediante M6PR y/o la sulfotransferasa en el TGN, la posible agregación de α -Gal A se evaluó *in vitro* a diversas concentraciones de enzima e ion hidrógeno. Como se muestra en la FIG. 27A, la cantidad de α -Gal A precipitada, comparada con aproximadamente 30% ($>2 \times 10^6$ U) a pH 5,0. A pH 6,0, el pH estimado del TGN (Griffith y Simons, 1986, Science 234: 438-443), aproximadamente 12% de la enzima formó agregados de partículas que pudieron sedimentarse mediante centrifugación a 15000 x g. la FIG. 27B muestra que la turbidez, como medida de la agregación (Halper y Stere, 1977, Arch. Biochem. Biophys. 184: 529-534), de soluciones que contienen de 0,1 a 10 mg/ml de α -Gal A a pH 5,0 o 7,0 incrementado en función de la concentración de enzima. Además, la presencia de concentraciones crecientes de albúmina de 0,1 a 10 mg/ml a pH 5,0 esencialmente no afectó a la turbidez de una solución de α -Gal A 1 mg/ml (FIG. 27B; control). Finalmente, la electroforesis de las fracciones sobrenadante y sedimento de las soluciones que contenían α -Gal A (10 mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA) (2 mg/ml) incubadas a diversas concentraciones de ion hidrógeno reveló que la precipitación creciente de α -Gal A con pH decreciente era específico de enzima, puesto que la BSA no precipitaba en este intervalo de pH (FIG. 27C).

10.3. Discusión

Se propone un modelo de "agregación-secreción" para explicar la reconducción de α -Gal A humana como prototipo de proteínas diana sobre-producidas. Como se representa en la FIG. 28, la enzima sobre-producida normalmente se sintetiza y procesa hasta que alcanza la red del trans-Golgi (TGN). En esta estructura, la enzima sobre-producida se

5 acumula y se somete a un ambiente marcadamente más ácido, (ap. pH 6,0), lo que conduce a interacciones proteína-proteína aumentadas que generan agregados de α -Gal A solubles y en partículas. Como resultado de tal agregación, los restos M6P de la enzima se vuelven inaccesibles o menos accesibles para unirse al MGPR. Los agregados con restos MGP inaccesibles, por defecto, se reconducen mediante la vía secretora constitutiva (Helms *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265: 20.027-20.032).

10 La respuesta celular, por lo tanto, a la sobre-producción de proteínas dirigidas a lisosomas es transportar las proteínas que tienen restos MGP disponibles al lisosoma y reconducir la mayoría de la proteínas sobre-producidas, y presumiblemente agregadas, a través de la vía de secreción constitutiva. El hecho de que grandes cantidades de α -Gal A humana recombinante se secreta por células CHO permite la producción a mayor escala y la fácil purificación de la enzima recombinante para cristalografía y para pruebas de terapia de sustitución de enzimas en pacientes con enfermedad de Fabry. Además, está claro que la serie de amplificación de células CHO con α -Gal A sobre-expresada proporciona un sistema mamífero experimental único para caracterizar eficazmente la biosíntesis, modificaciones posteriores a la traducción y mecanismos responsables de la fijación de objetivo lisosomal y la secreción selectiva de esta enzima lisosomal prototipo, proporcionando así un mayor conocimiento de la naturaleza del transporte y selección de proteínas en células de mamíferos.

15 Así, la sobre-expresión de proteínas lisosomales y quizás dirigidas a otros sitios en células CHO proporciona un método conveniente para producir grandes cantidades de la proteína para análisis estructural y/o aplicaciones terapéuticas, así como proporcionar un planteamiento útil para estudiar la biosíntesis y selección de proteínas.

11. Depósito de microorganismos

20 Las siguientes cepas de E. coli que llevan los plásmidos de la lista se han depositado en la Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL y se les ha asignado el siguiente número de entrada:

<u>Célula hospedante</u>	<u>Cepa</u>	<u>Plásmido</u>	<u>Nº de entrada</u>
<i>E. coli</i>	k12	p91.AGA	B 18722
<i>E. coli</i>	k12	pAGA-PA	B 18723

25

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: La Escuela de Medicina Mount Sinai
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Método para producir proteínas secretadas
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 13
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Jones Day
- (B) CALLE: Prinzregentenstrasse 11
- (C) CIUDAD: 90538 Múnich
- (D) PAIS: Alemania

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO MEDIO: CD-ROM
- (B) ORDENADOR: PC compatible de IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOPORTE LOGICO: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NUMERO DE SOLICITUD: 07022356.5
- (B) FECHA DE PRESENTACION: 30-NOV-1993
- (C) CLASIFICACION: divisional de 00200454.7

(vii) INFORMACION DEL MANDATARIO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: Dr. Martin Weber
- (B) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: J101694EPT1

(viii) INFORMACION DE TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELEFONO: 49 (0) 89 20 60 42 200
- (B) TELEFAX: 49 (0) 89 20 60 42 293

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1393 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 61..1350

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

```

AGGTTAATCT TAAAGCCCA GGTACCCGC GGAATTAT GCTGTCCGGT CACCGTGACA      60
ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA CTA CAT CTG GGC TGC GCG CTT GCG CTT      108
Met Gln Leu Arg Arg Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
  1           5           10           15
    
```

CGC TTC CTG GCC CTC GTT TCC TGG GAC ATC CCT GGG GCT AGA GCA CTG	156
Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu	
20 25 30	
CAC AAT GGA TTG GCA AGG ACG CCT ACC ATG GGC TGG CTG CAC TGG GAG	204
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu	
35 40 45	
CGC TTC ATG TGC AAC CTT GAC TGC CAG GAA GAG CCA GAT TCC TGC ATC	252
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile	
50 55 60	
AGT GAG AAG CTC TTC ATG GAG ATG GCA GAG CTC ATG GTC TCA GAA GGC	300
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly	
65 70 75 80	
TGG AAG GAT GCA GGT TAT GAG TAC CTC TGC ATT GAT GAC TGT TGG ATC	348
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met	
85 90 95	
GCT CCC CAA AGA GAT TCA GAA GGC AGA CTT CAG GCA GAC CCT CAG GGC	396
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg	
100 105 110	
TTT CCT CAT GGC ATT CCC CAG CTA GCT AAT TAT GTT CAC AGC AAA GGA	444
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly	
115 120 125	
CTC AAC CTA GGC ATT TAT GCA GAT GTT GGA AAT AAA ACC TGC GCA GGC	492
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly	
130 135 140	
TTC CCT GGG AGT TTT GGA TAC TAC GAC ATT GAT GCC CAG ACC TTT GCT	540
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala	
145 150 155 160	
GAC TGG GGA GTA GAT CTC CTA AAA TTT GAT GGT TGT TAC TGT GAC AGT	588
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser	
165 170 175	
TTG GAA AAT TTG GCA GAT GGT TAT AAG CAC ATG TCC TTG GCC CTG AAT	636
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn	
180 185 190	
AGC ACT GGC AGA AGC ATT GTG TAC TCC TGT GAG TGG CCT CTT TAT ATC	684
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met	
195 200 205	
TGG CCC TTT CAA AAG CCC AAT TAT ACA GAA ATC CGA CAG TAC TGC AAT	732
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn	
210 215 220	
CAC TGG CGA AAT TTT GCT GAC ATT GAT CAT TCC TGG AAA AGT ATA AAG	780
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys	
225 230 235 240	
AGT ATC TTG GAC TGG ACA TCT TTT AAC CAG GAG AGA ATT GTT GAT GTT	828
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val	
245 250 255	
CCT GCA CCA GGG GGT TGG AAT GAC CCA GAT ATC TTA GTC ATT GCC AAC	876
Ala Gly Pro Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn	
260 265 270	
TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG CAA GTA ACT CAG ATG GCC CTC TGG GCT	924
Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala	
275 280 285	

ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC ATG TCT AAT GAC CTC CGA CAC ATC AGC Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser 290 295 300	972
CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT CAG GAT AAG GAC GTA ATT GCC ATC AAT Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn 305 310 315 320	1020
CAG CAC CCC TTG GGC AAG CAA GGG TAC CAG CTT AGA CAG GGA GAC AAC Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn 325 330 335	1068
TTT GAA GTG TCG GAA CGA CCT CTC TCA GGC TTA GCC TGG GCT GTA GCT Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala 340 345 350	1116
ATG ATA AAC CCG CAG CAG ATT GGT GGA CCT CGC TCT TAT ACC ATC GCA Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala 355 360 365	1164
GTT GCT TCC CTC GGT AAA GGA GTG GCC TCT AAT CCT GCC TGC TTC ATC Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile 370 375 380	1212
ACA CAC CTC CTC CCT GTC AAA AGG AAG CTA GGG TTC TAT GAA TCG ACT Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr 385 390 395 400	1260
TCA AGC TTA AGA ACT CAC ATA AAT CCC ACA GGC ACT GTT TTG CTT CAG Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln 405 410 415	1308
CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT TAAAAA Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu 420 425 430	1357
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1393

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 429 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu 1 5 10 15
Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu 20 25 30
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu 35 40 45
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile 50 55 60
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly 65 70 75 80
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met 85 90 95

Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
 100 105 110

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
 115 120 125

Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
 130 135 140

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
 145 150 155 160

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
 165 170 175

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
 180 185 190

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
 195 200 205

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
 210 215 220

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
 225 230 235 240

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
 245 250 255

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
 260 265 270

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
 275 280 285

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
 290 295 300

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
 305 310 315 320

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
 325 330 335

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
 340 345 350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
 355 360 365

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
 370 375 380

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
 385 390 395 400

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Glu
 405 410 415

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 420 425

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 411 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 3

Met Leu Leu Lys Thr Val Leu Leu Leu Gly His Val Ala Gln Val Leu
 1 5 10 15

Met Leu Asp Asn Gly Leu Leu Gln Thr Pro Pro Met Gly Trp Leu Ala
 20 25 30

Trp Glu Arg Phe Arg Cys Asn Ile Asn Cys Asp Glu Asp Pro Lys Asn
 35 40 45

Cys Ile Ser Glu Gln Leu Phe Met Glu Met Ala Asp Arg Met Ala Gln
 50 55 60

Asp Gly Trp Arg Asp Met Gly Tyr Thr Tyr Leu Asn Ile Asp Asp Cys
 65 70 75 80

Trp Ile Gly Gly Arg Asp Ala Ser Gly Arg Leu Met Pro Asp Pro Lys
 85 90 95

Arg Phe Pro His Gly Ile Pro Phe Leu Ala Asp Tyr Val His Ser Leu
 100 105 110

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Met Gly Asn Phe Thr Cys Met
 115 120 125

Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Leu Asp Lys Val Val Gln Asp Ala Gln Thr
 130 135 140

Phe Ala Glu Trp Lys Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Gly Cys Phe Ser
 145 150 155 160

Thr Pro Glu Glu Arg Ala Gln Gly Tyr Pro Lys Met Ala Ala Ala Leu
 165 170 175

Asn Ala Thr Gly Arg Pro Ile Ala Phe Ser Cys Ser Trp Pro Ala Tyr
 180 185 190

Glu Gly Gly Leu Pro Pro Arg Val Asn Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Ile
 195 200 205

Cys Asn Leu Trp Arg Asn Tyr Asp Asp Ile Gln Asp Ser Trp Trp Ser
 210 215 220

Val Leu Ser Ile Leu Asn Trp Phe Val Glu His Gln Asp Ile Leu Gln
 225 230 235 240

Pro Val Ala Gly Pro Gly His Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Leu Ile
 245 250 255

Gly Asn Phe Gly Leu Ser Leu Glu Gln Arg Ser Arg Ala Gln Met Ala
 260 265 270

Leu Trp Thr Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Met Ser Thr Asp Leu Arg
 275 280 285

Thr Ile Ser Ala Gln Asn Met Asp Ile Leu Gln Asn Pro Leu Met Ile
 290 295 300

Lys Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Ile Gln Gly Arg Ile His Lys Glu
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ile Glu Val Tyr Met Arg Pro Leu Ser Asn Lys Ala Ser
 325 330 335

Ala Leu Val Phe Phe Ser Cys Arg Thr Asp Met Pro Tyr Arg Tyr His
 340 345 350

Ser Ser Leu Gly Gln Leu Asn Phe Thr Gly Ser Val Ile Tyr Glu Ala
 355 360 365

Gln Asp Val Tyr Ser Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Arg Asp Glu Thr
 370 375 380

Asn Phe Thr Val Ile Ile Asn Pro Ser Gly Val Val Met Trp Tyr Leu
 385 390 395 400

Tyr Pro Ile Lys Asn Leu Glu Met Ser Gln Gln
 405 410

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 404 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 4

```

Met Phe Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Cys Ile Ser Leu Lys Gly Val
 1          5          10          15
Phe Gly Ser Tyr Asn Gly Leu Gly Leu Thr Pro Gln Met Gly Trp Asp
          20          25          30
Asn Trp Asn Thr Phe Ala Cys Asp Val Ser Glu Gln Leu Leu Leu Asp
          35          40          45
Thr Ala Asp Arg Ile Ser Asp Leu Gly Leu Lys Asp Met Gly Tyr Lys
 50          55          60
Tyr Ile Ile Leu Asp Asp Cys Trp Ser Ser Gly Arg Asp Ser Asp Gly
 65          70          75          80
Phe Leu Val Ala Asp Glu Gln Lys Phe Pro Asn Gly Met Gly His Val
          85          90          95
Ala Asp His Leu His Asn Asn Ser Phe Leu Phe Gly Met Tyr Ser Ser
          100          105          110
Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Ala Gly Tyr Pro Gly Ser Leu Gly Arg Glu
          115          120          125
Glu Glu Asp Ala Gln Phe Phe Ala Asn Asn Arg Val Asp Tyr Leu Lys
          130          135          140
Tyr Asp Asn Cys Tyr Asn Lys Gly Gln Phe Gly Thr Pro Glu Ser Tyr
          145          150          155          160
Arg Lys Met Ser Asp Ala Leu Asn Lys Thr Gly Arg Pro Ile Phe Tyr
          165          170          175
    
```

Ser Cys Asn Trp Gly Leu Tyr Gly Ser Gly Ile Ala Asn Ser Trp Arg
 180 185 190
 Met Ser Gly Asp Val Thr Ala Glu Phe Thr Arg Pro Asp Ser Cys Pro
 195 200 205
 Asp Gly Tyr Tyr Ala Gly Phe Ser Ile Met Asn Ile Leu Asn Lys Ala
 210 215 220
 Ala Pro Met Gly Gln Asn Ala Gly Val Gly Gly Trp Asn Asp Leu Asp
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Val Gly Val Gly Asn Leu Thr Asp Asp Glu Glu Lys Ala
 245 250 255
 His Phe Ser Met Trp Ala Met Val Lys Ser Pro Leu Ile Ile Gly Ala
 260 265 270
 Asn Val Asn Asn Leu Lys Ala Ser Ser Tyr Ser Ile Tyr Ser Gln Ala
 275 280 285
 Ser Val Ile Ala Ile Asn Gln Asp Ser Asn Gly Ile Pro Ala Arg Val
 290 295 300
 Ser Asp Thr Asp Glu Tyr Gly Glu Ile Trp Ser Gly Pro Leu Asp Asn
 305 310 315 320
 Gly Asp Gln Val Val Ala Leu Leu Asn Gly Gly Ser Val Ser Arg Pro
 325 330 335
 Met Asn Thr Thr Leu Glu Ile Asp Ser Leu Gly Lys Lys Leu Thr Ser
 340 345 350
 Thr Asp Asp Leu Trp Ala Asn Arg Val Thr Ala Ser Ile Gly Arg Lys
 355 360 365
 Thr Gly Leu Tyr Glu Tyr Lys Asp Gly Leu Lys Asn Arg Leu Gly Gln
 370 375 380
 Lys Gly Ser Leu Ile Leu Asn Val Pro Ala His Ile Ala Phe Arg Leu
 385 390 395 400
 Arg Pro Ser Ser

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 5

Glu Gln Thr Ile Ala Asp Thr Leu Gly Pro Gly Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 6

Pro Ser Val Ile Tyr Gly Asn Val Arg Asn
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 7

Glu Val Ala Cys Leu Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln Pro
1 5 10

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 297 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: doble
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 1..279

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 8

GAA TGG ACT TCA AGC TTA ACA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGA ACT GTT	48
Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val	
1 5 10 15	
TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC TTA CTT	96
Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu	
20 25 30	
CCG GCT GGT CCG GCG CAA CAC GAT GAA GCT CAA CAA AAT GCT TTT TAT	144
Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr	
35 40 45	
CAA GTC TTA AAT ATG CCT AAC TTA AAT GCT GAT CAA CGC AAT GGT TTT	192
Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe	
50 55 60	
ATC CAA AGC CTT AAA GAT GAT CCA AGC CAA AGT GCT AAC GTT TTA GGT	240
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly	
65 70 75 80	
GAA GCT CAA AAA CTT AAT GAC TCT CAA CCT CCA AAA TAAGGATCCC	286
Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys	
85 90	
CGAATTCGGC C	297

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 92 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 9

Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 20 25 30
 Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 35 40 45
 Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
 50 55 60
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
 85 90

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 10

CCGAATTCAT GCTGTCCGGT CACCGTC

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 11

CGCCGGACCA GCCCGAAGTA AGTCTTTTAA TC

32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 12

30 **CCGGCTGGTC CCGCCCAACA CGATGAACCT**

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 13

GGCCGAATTC CCGGATCCTT ATTTGGAGC TGCAGA

36

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una α -galactosidasa A humana secretada, que comprende:

(a) amplificar una secuencia de nucleótidos de α -galactosidasa A en una célula CHO modificada por ingeniería genética que expresa α -galactosidasa A y dihidrofolato reductasa (DHFR);

5 (b) cultivar dicha célula en condiciones en las que la α -galactosidasa A se sobreexpresa dando como resultado la formación de estructuras cristalinas que contienen α -galactosidasa A humana en vesículas limitadas por membrana, y en las que dicha α -galactosidasa A se secreta al medio de cultivo celular; y

(c) aislar dicha α -galactosidasa A del medio de cultivo celular,

10 en el que dicha α -galactosidasa A contiene manosa-6-fosfato, y en el que la célula puede obtenerse por crecimiento por etapas en concentraciones de metotrexato crecientes hasta 1000 μ M.

-60 AGGTTA

ATCT TAAAAGCCCA GGTTACCCGC GGAAATTTAT GCTGTCCGGT CACCGTGACA -1

1 ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA CTA CAT CTG GGC TGC GCG CTT GCG
 1 Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala

CTT CGC TTC CTG GCC CTC GTT TCC TGG GAC ATC CCT GGG GCT AGA 90
 Leu Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg 30

91 GCA CTG GAC AAT GGA TTG GCA AGG ACG CCT ACC ATG GGC TGG CTG
 31 Ala Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu

N-Ter

CAC TGG GAG CGC TTC ATG TGC AAC CTT GAC TGC CAG GAA GAG CCA 180
 His Trp Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro 60
Ser Arg

181 GAT TCC TGC ATC AGT GAG ARG CTC TTC ATG GAG ATG GCA GAG CTC
 61 Asp Ser Cys Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu
X X Ser

ATG GTC TCA GAA GGC TGG AAG GAT GCA GGT TAT GAG TAC CTC TGC 270
 Met Val Ser Glu Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys 90

271 ATT GAT GAC TGT TGG ATG GCT CCC CAA AGA GAT TCA GAA GGC AGA
 91 Ile Asp Asp Cys Trp Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg

CTT CAG GCA GAC CCT CAG CGC TTT CCT CAT GGG ATT CGC CAG CTA 360
 Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu 120

361 GCT AAT TAT GTT CAC AGC AAA GGA CTG AAG CTA GGG ATT TAT GCA
 121 Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala

GAT GTT GGA AAT AAA ACC TGC GCA GGC TTC CCT GGG AGT TTT GGA 450
 Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly 150
 CHD -----

451 TAC TAC GAC ATT GAT GCC CAG ACC TTT GCT GAC TGG GGA GTA GAT
 151 Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gly Val Asp

CTG CTA AAA TTT GAT GGT TGT TAC TGT GAC AGT TTG GAA AAT TTG 540
 Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu 180

FIG. 1A

541 GCA GAT GGT TAT AAG CAC ATG TCC TTG GCC CTG AAT AGG ACT GGC
 181 Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn Arg Thr Gly
 CHO -----

AGA AGC ATT GTG TAC TCC TGT GAG TGG CCT CTT TAT ATG TGG CCC 630
 Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met Trp Pro 210

631 TTT CAA AAG CCC AAT TAT ACA GAA ATC CGA CAG TAC TGC AAT CAC
 211 Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn His
 CHO -----

TGG CGA AAT TTT GCT GAC ATT GAT GAT TCC TGG AAA AGT ATA AAG 720
 Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys 240
 Asn X

T-49 -----

721 AGT ATC TTG GAC TGG ACA TCT TTT AAC CAG GAG AGA ATT GTT GAT
 241 Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp

GTT GCT GGA CCA GGG GGT TGG AAT GAC CCA GAT ATG TTA GTG ATT 810
 Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile 270

811 GGC AAC TTT GGC CTC AGC TGG AAT CAG CAA GTA ACT CAG ATG GCC
 271 Gly Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala

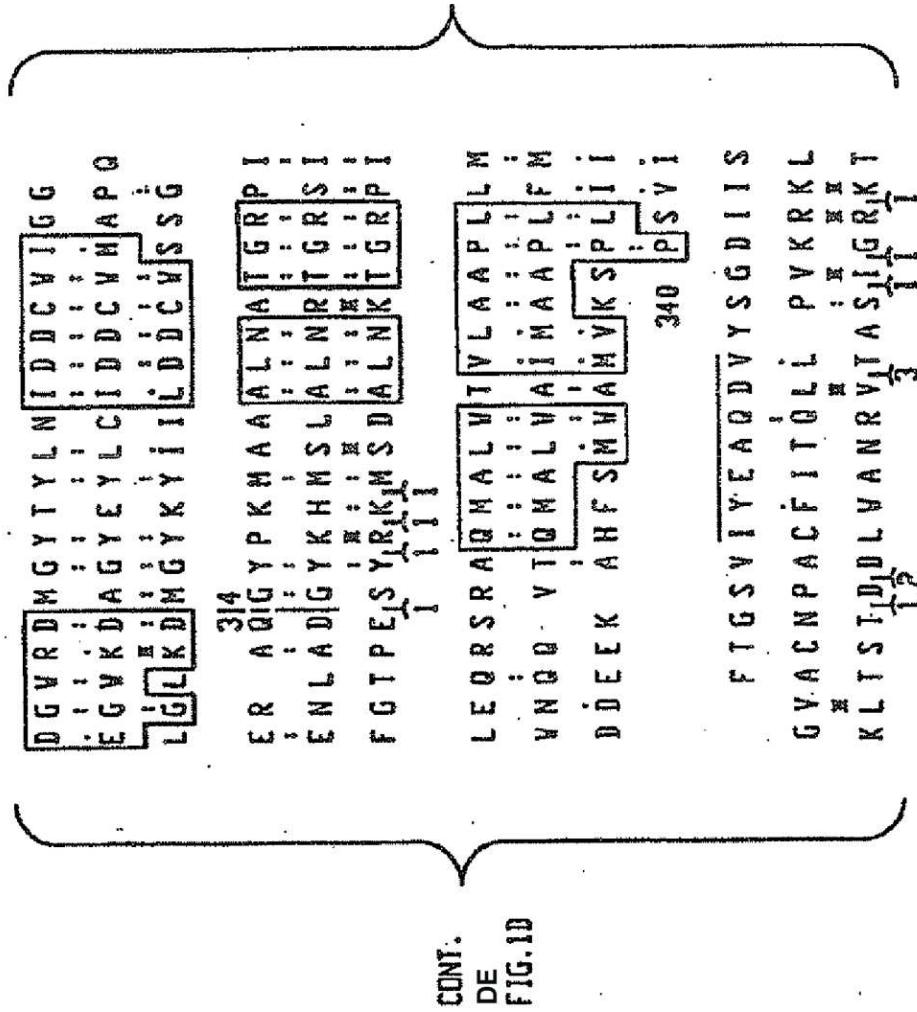
CTC TGG GCT ATC ATG GCT GCT CCT TTA TTC ATG TCT AAT GAC CTC 900
 Leu Trp Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu 300
 CB-1 -----

901 CGA CAC ATC AGC CCT CAA GCC AAA GCT CTC CTT CAG GAT AAG GAC
 301 Arg His Ile Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp
 X X

T-53B -----

GTA ATT GCC ATC AAT CAG GAC CCC TTG GGC AAG CAA GGG TAC CAG 990
 Val Ile Ala Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln 330
 Arg Glu

FIG.1B



CONT. EN FIG. 1D

CONT. EN FIG. 1F

FIG. 1E

MLLKTVLLLGHVAQVLM 17

MQLRNPELHGCALALRFLALVSVDPGARA 31

MFAFYFLTACISLKGVFG 18

RDA SGR LMPDPKRFPHGIPFLADYVHS L GLKL 116

RDS EGR LQADPQRFPHGIRQLAN YVHSK GLKL 131

RDS D GFLVADEQKFPNGM GHVADHLHNN SFLF 107

AFSC SVPAYEGGLPPRVNYSLLADICNLWRNY 215

VYSC EWP LYKPF QKPNYYTEIRQYCNHWRNF 229

FYSICNVGLYGSIGIAN SVRMSGDVTAEFFTRP 204

STD LRTISAQNHDI LQNPLMIK INQDPLGIQG 315

SND LRHISPQAKALLODKDVIA INQDPLGKQG 328

GANNVNLKASSYSIYSQASVIA INQD\$NIGIPA 302

YGNVVRN 349 363 EVA CLVDAN GIGP 375

GLRDET N FTVITINPSGVVMWYLYPIKNLEMSQD 411

G FYE VTSRLRS HINPTITVLLQLENTMNSLKDLL 429

IGL YIEYK DGLK NRIJGQKGS LJL NVP AHI AFR LRPSS 404

CONT.
DE
FIG.1E

FIG.1F

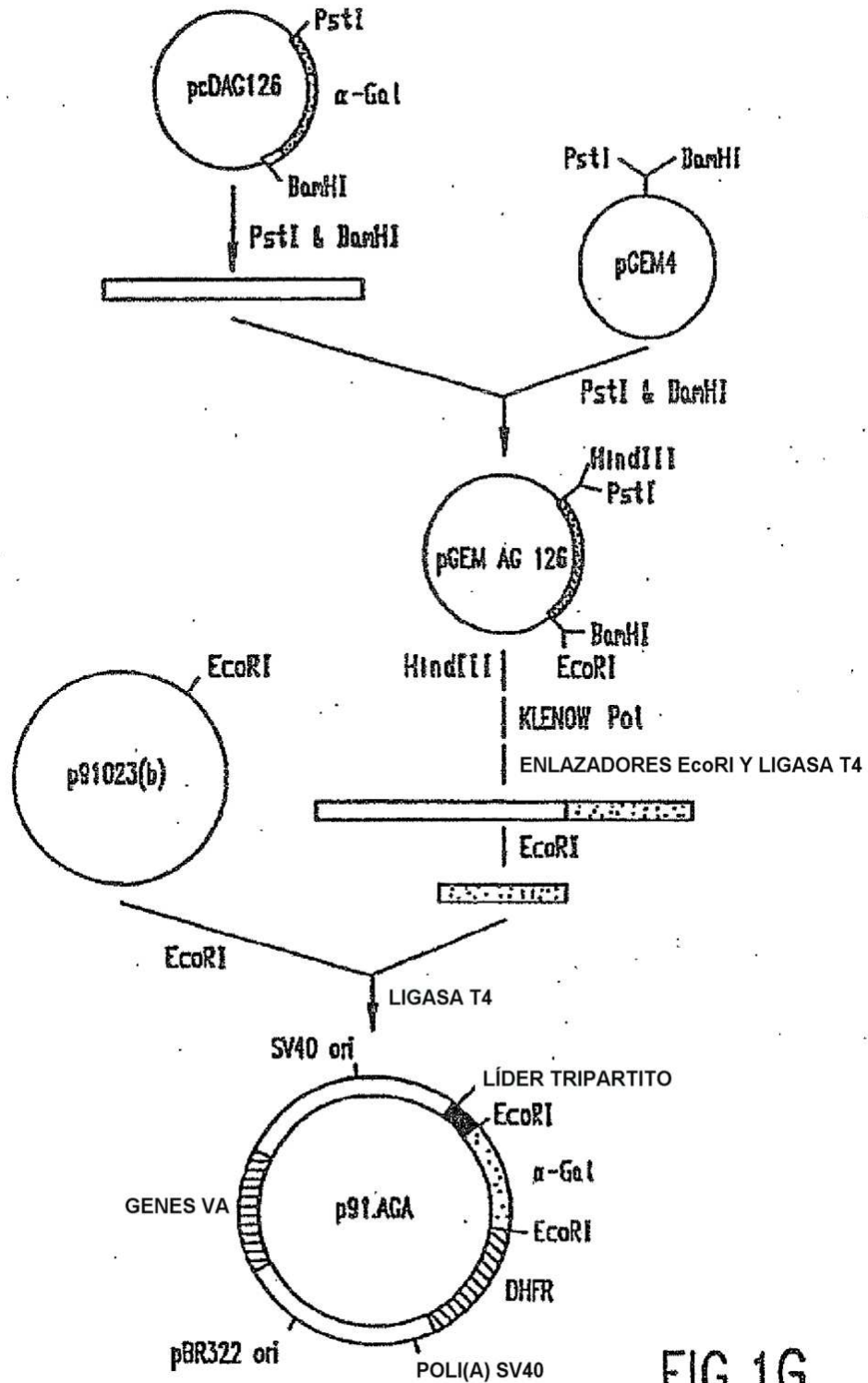


FIG.1G

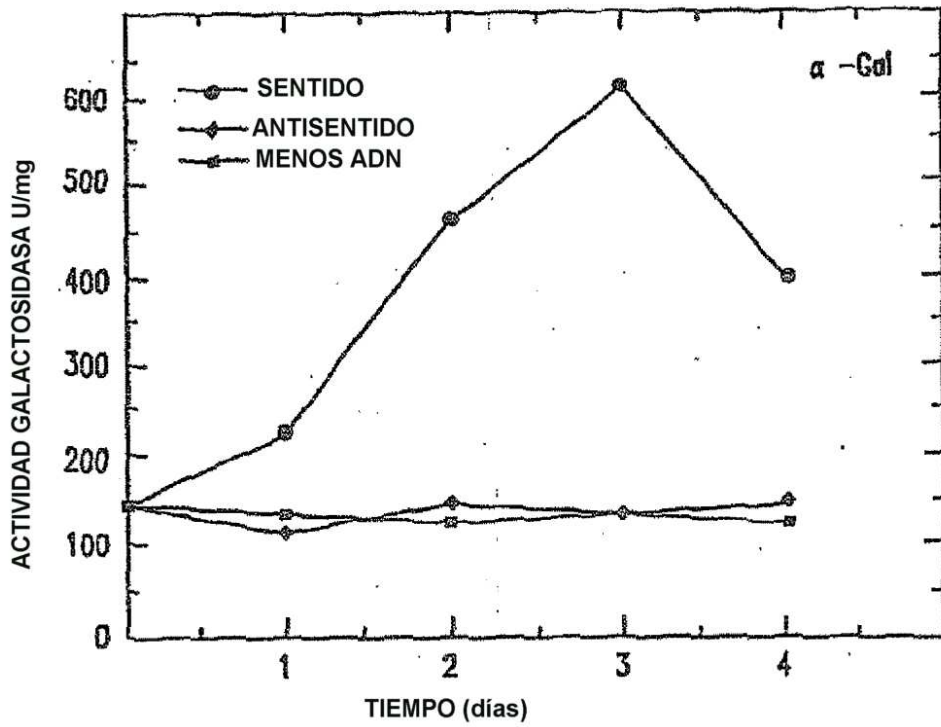


FIG.2A

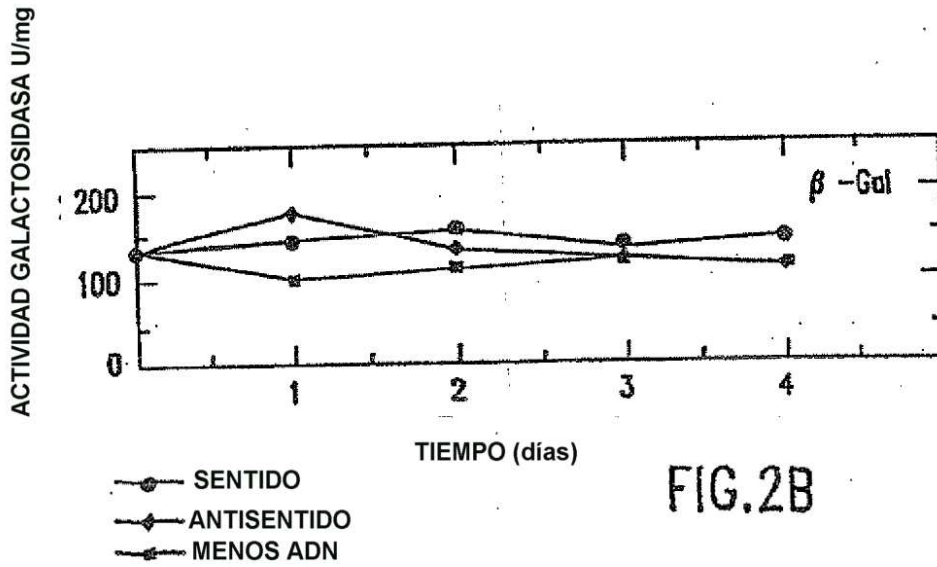


FIG.2B

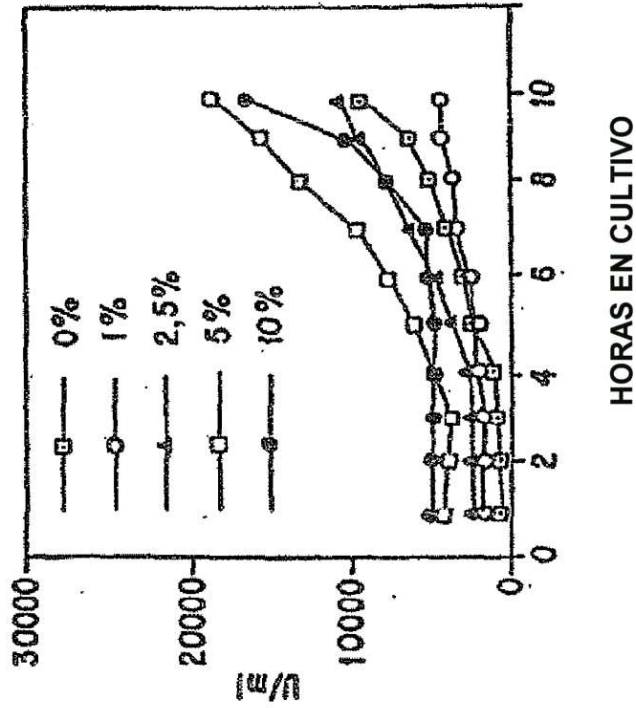


FIG. 3B

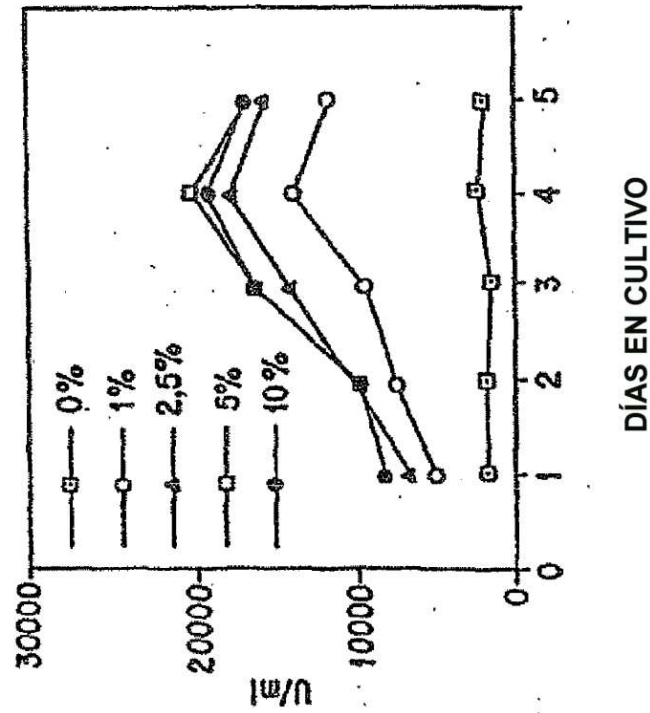


FIG. 3A

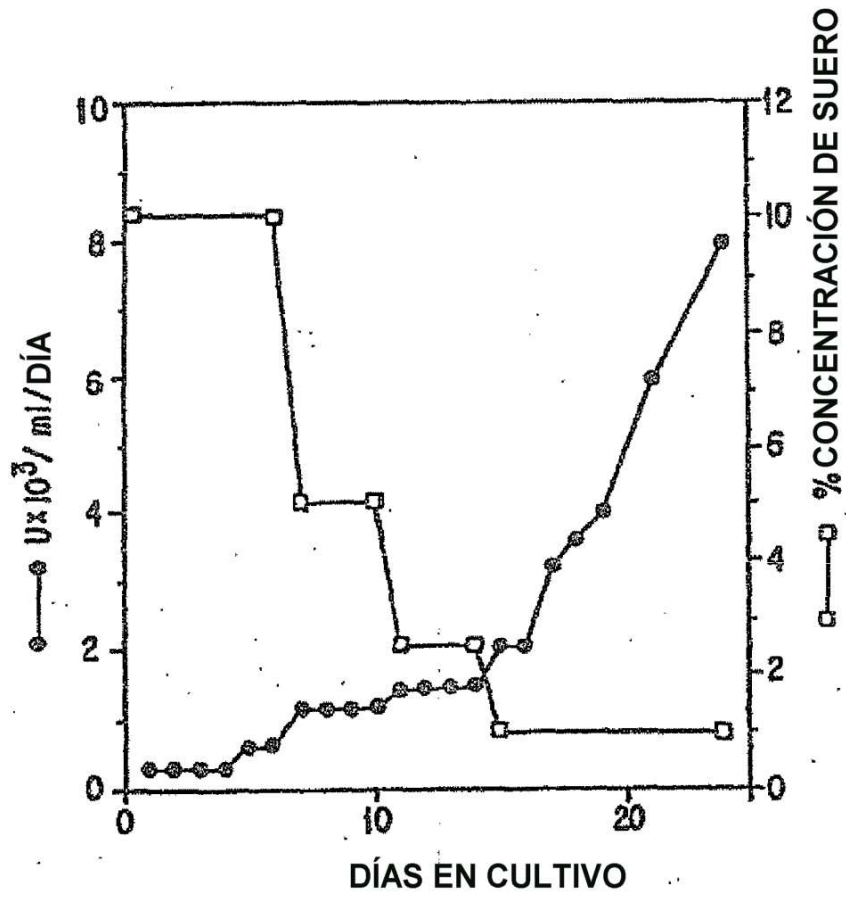


FIG. 4



FIG.5

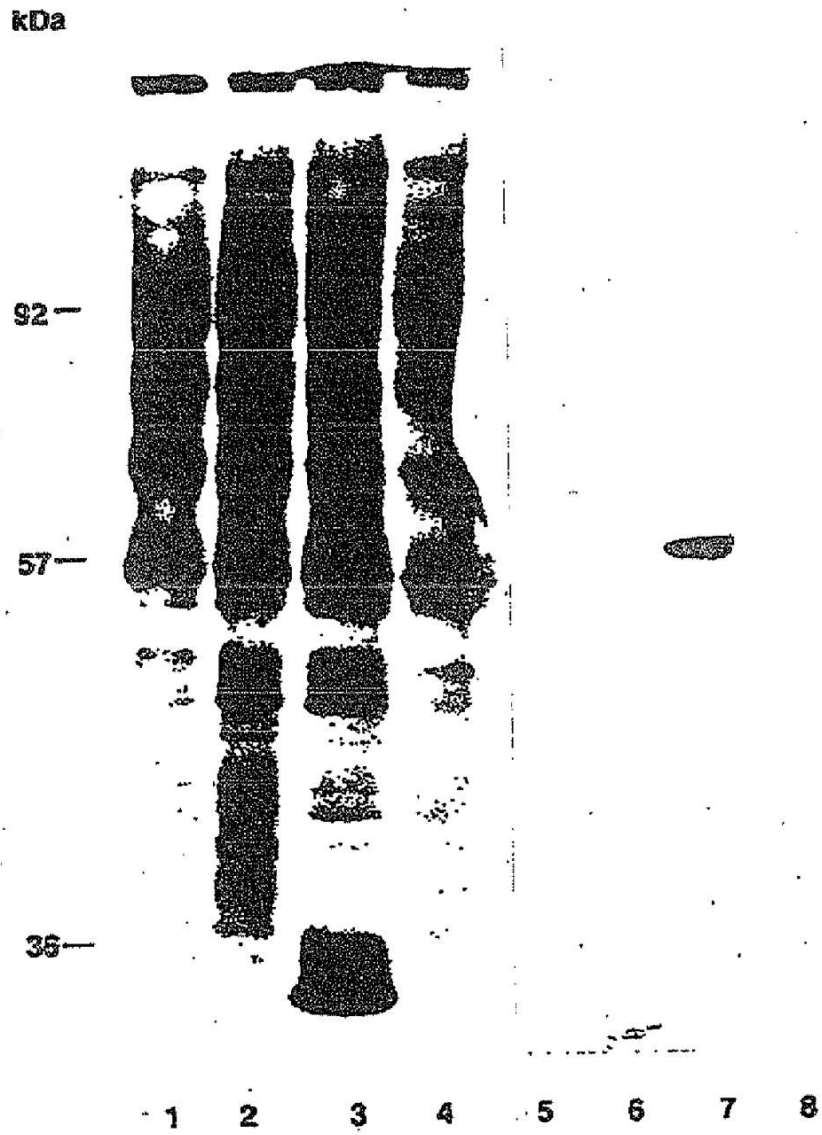


FIG.6

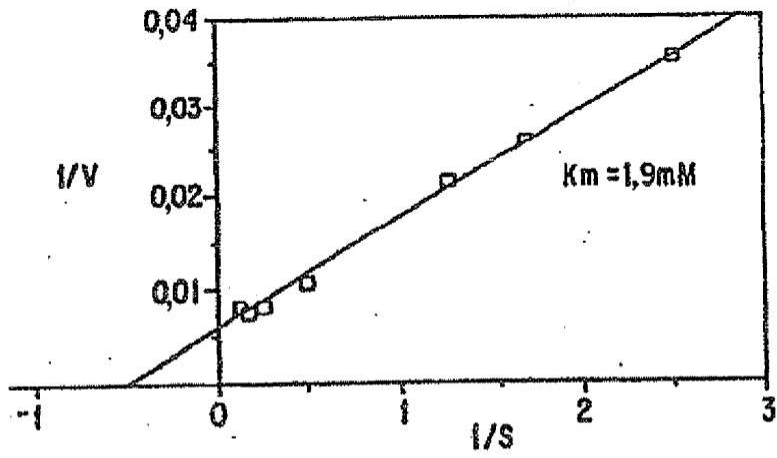


FIG.7A

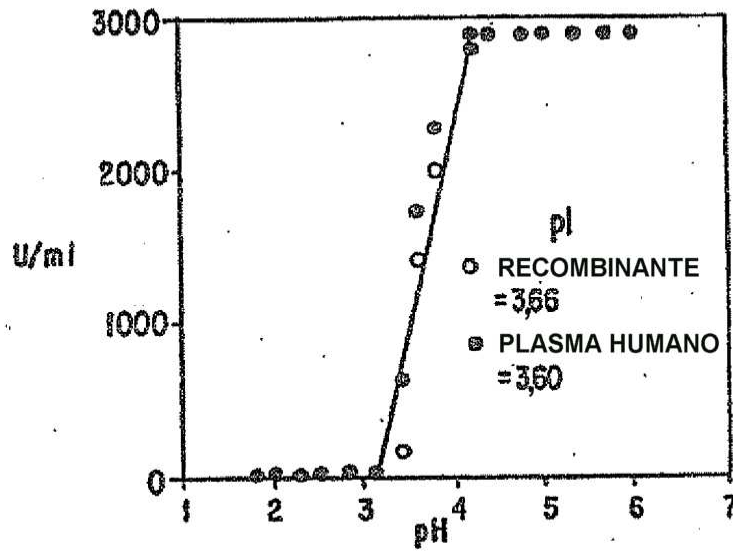


FIG.7B

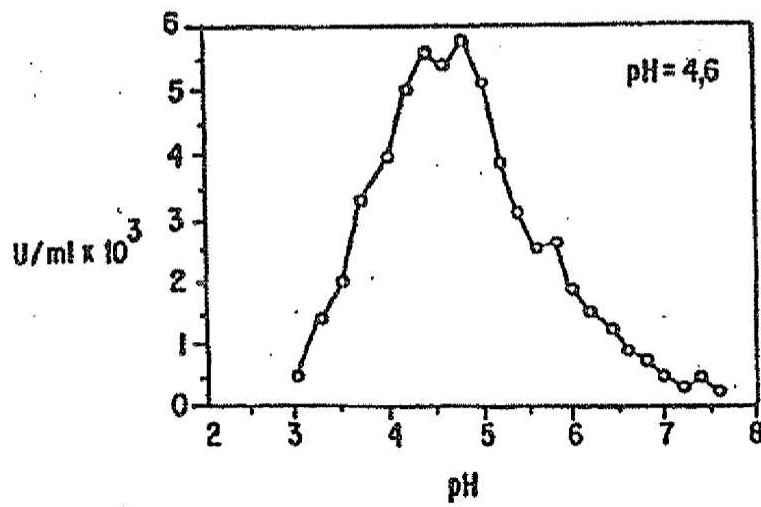


FIG.7C

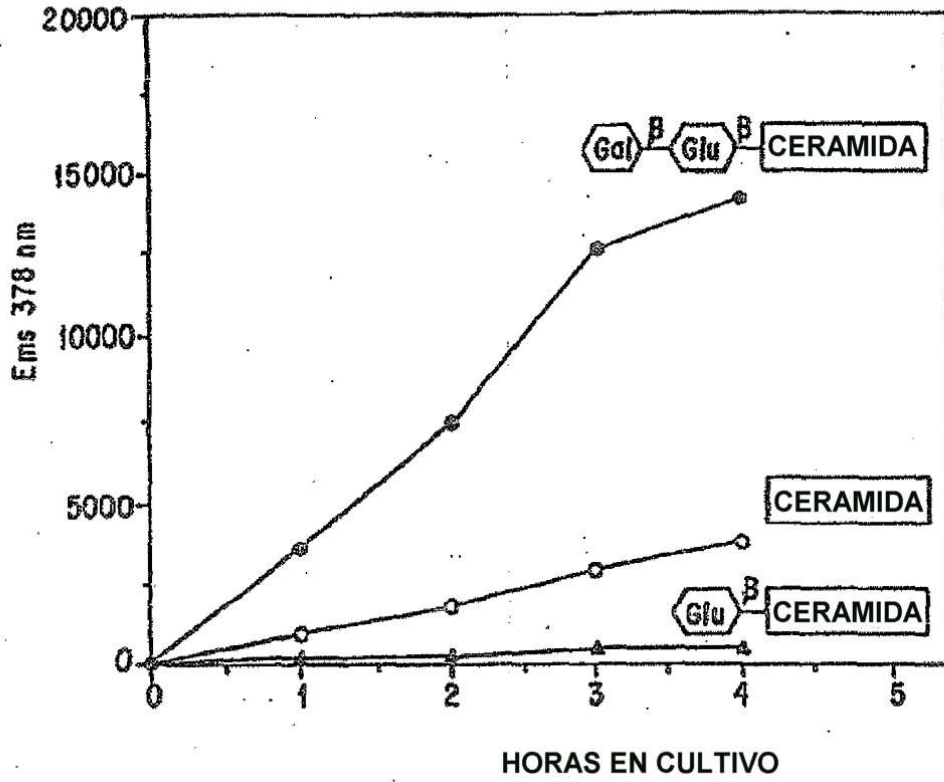


FIG. 8A

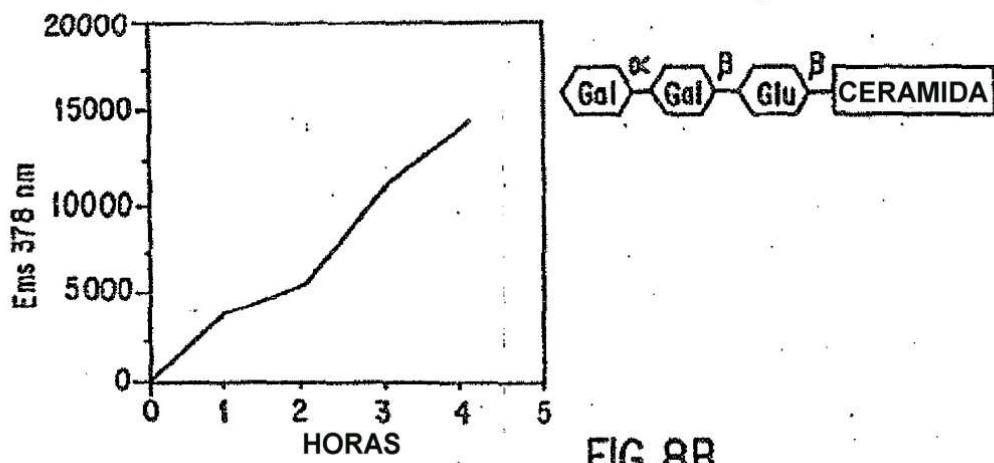


FIG. 8B

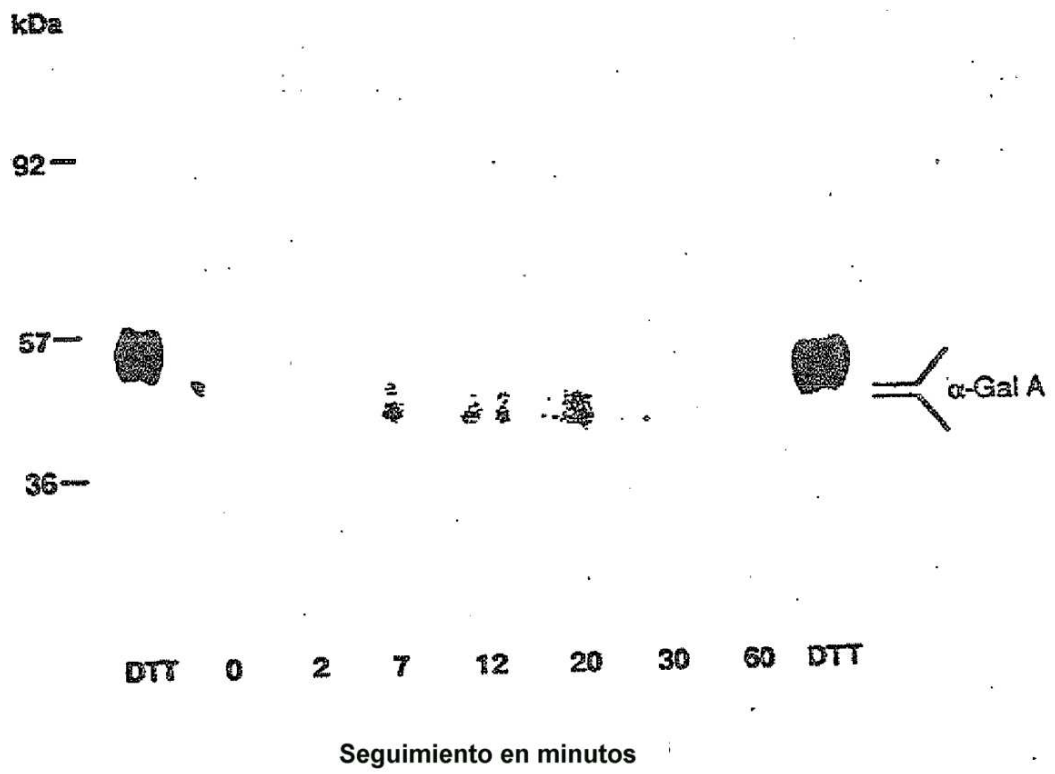


FIG.9

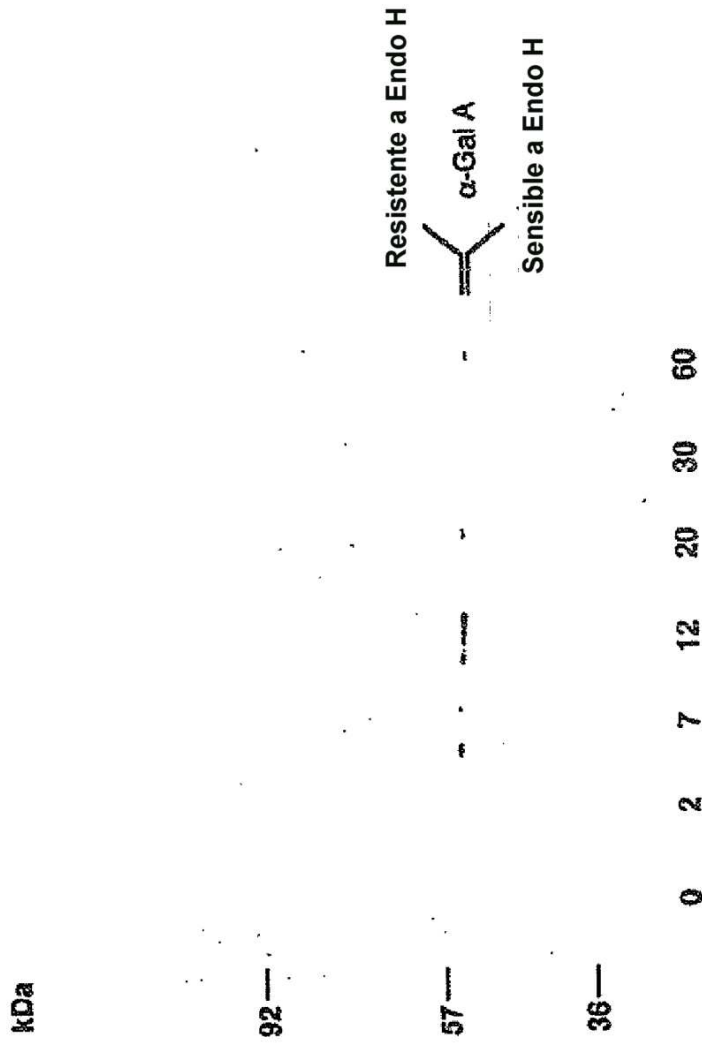


FIG.10

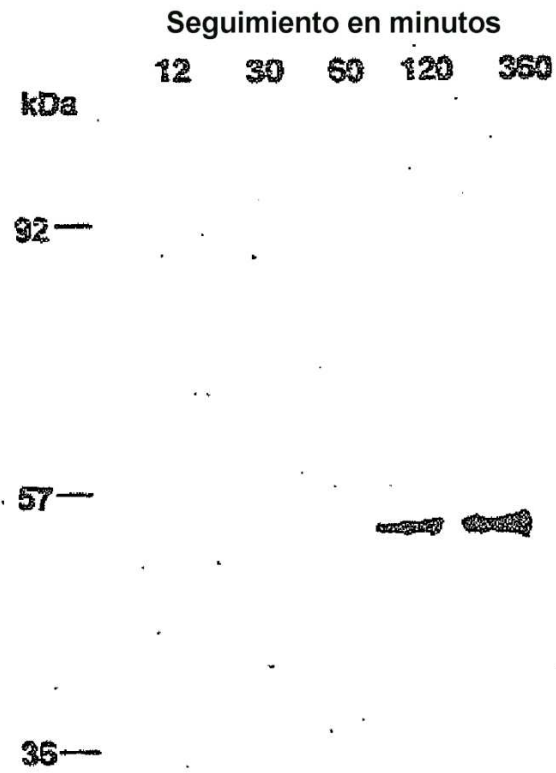


FIG. 11

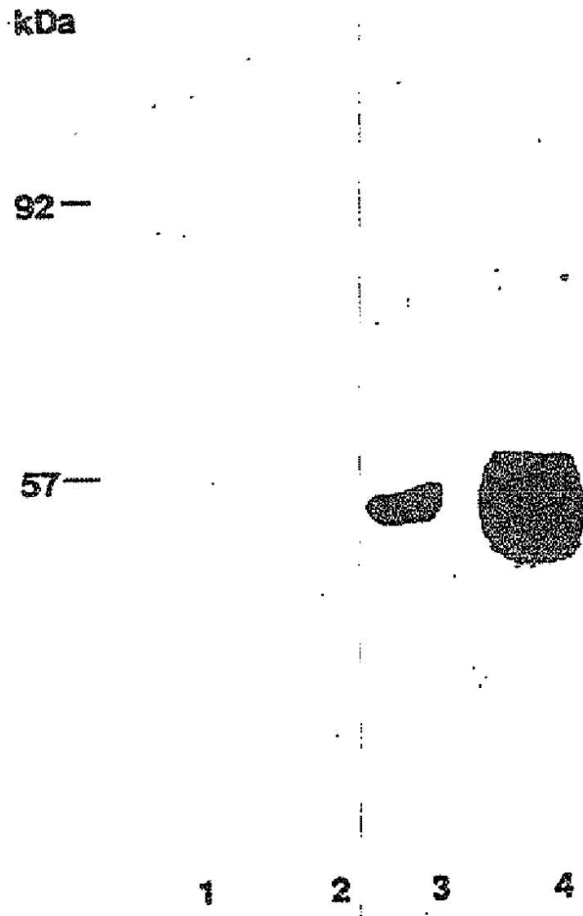


FIG.12

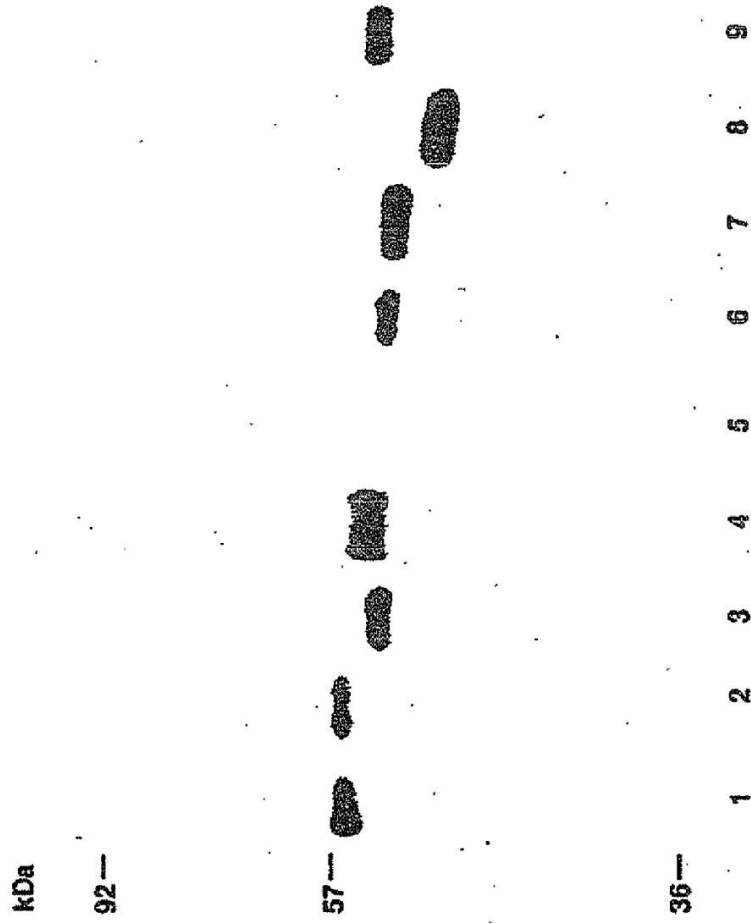


FIG.13

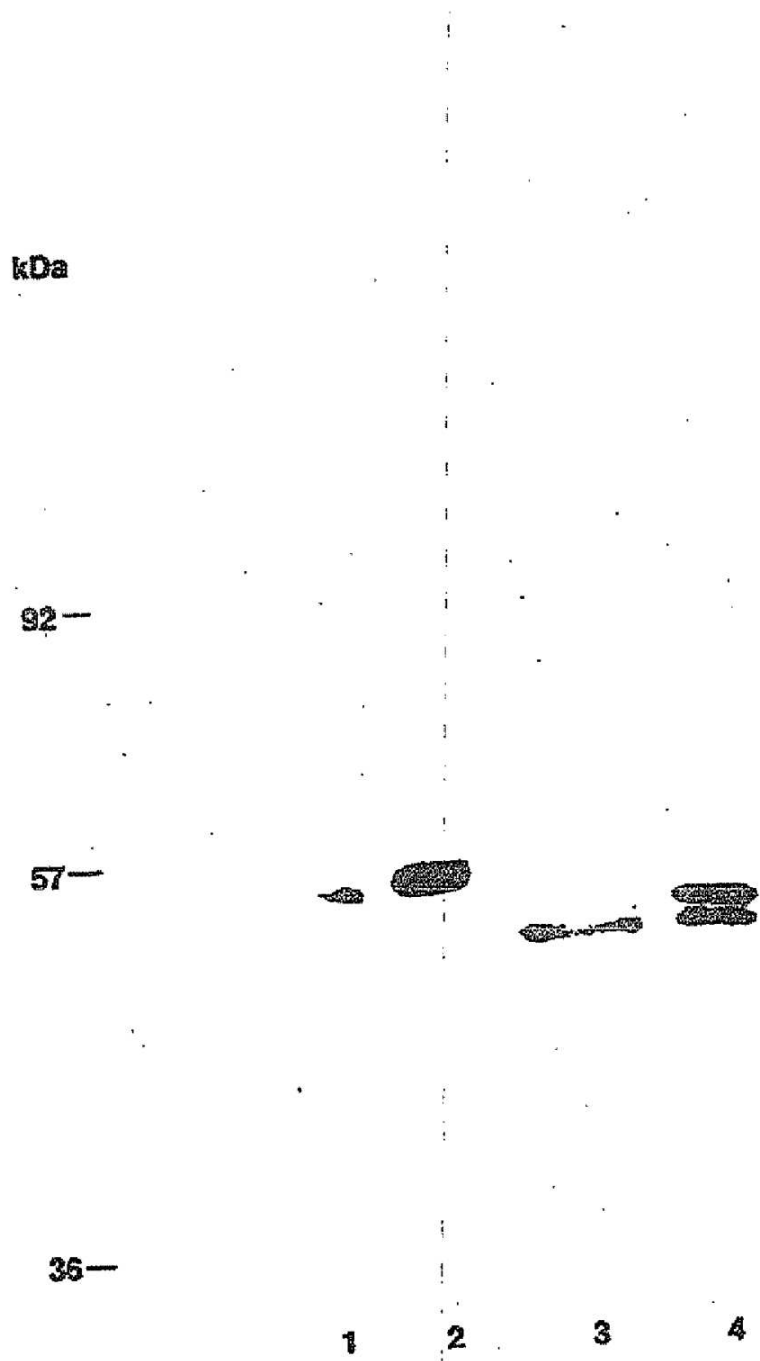


FIG. 14

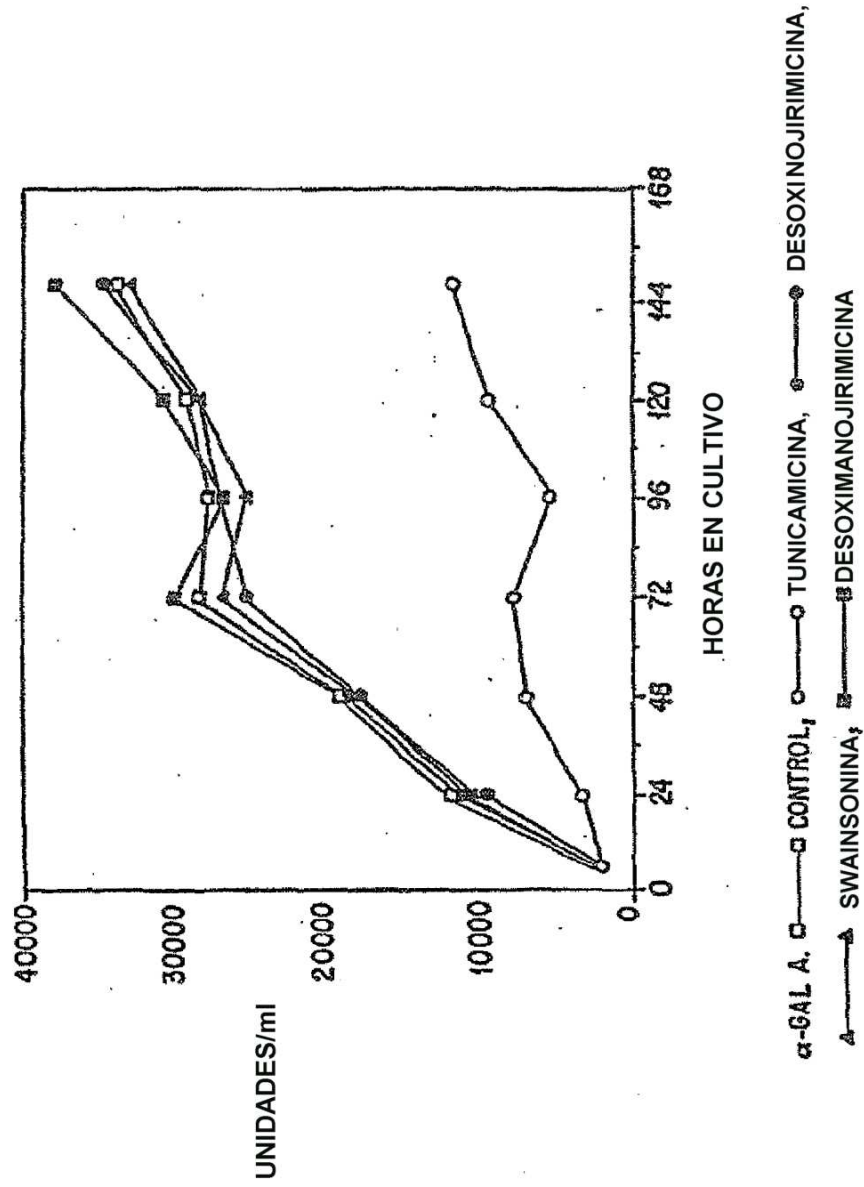


FIG.15

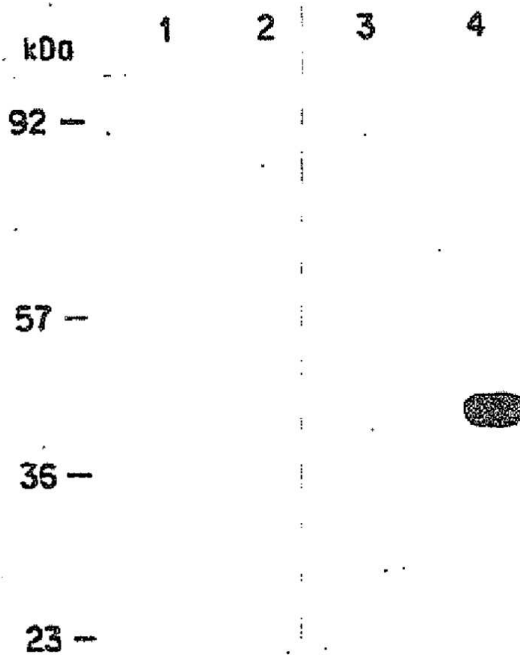


FIG.16

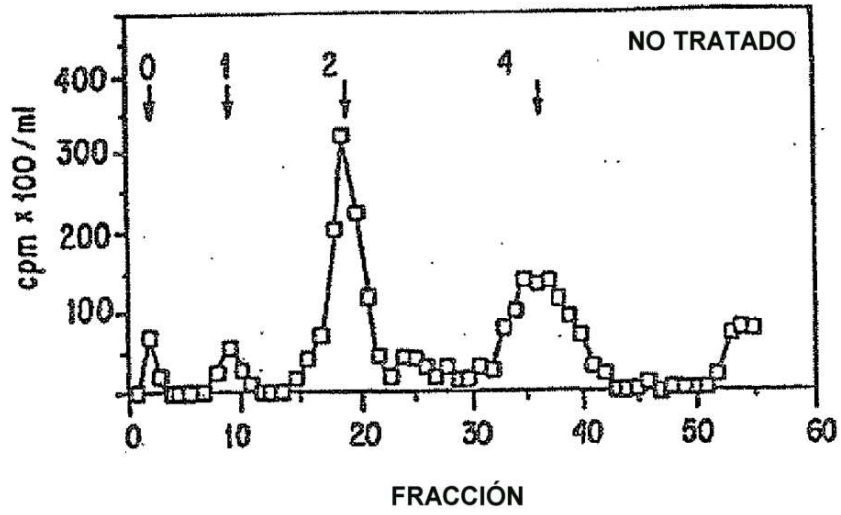


FIG. 17A

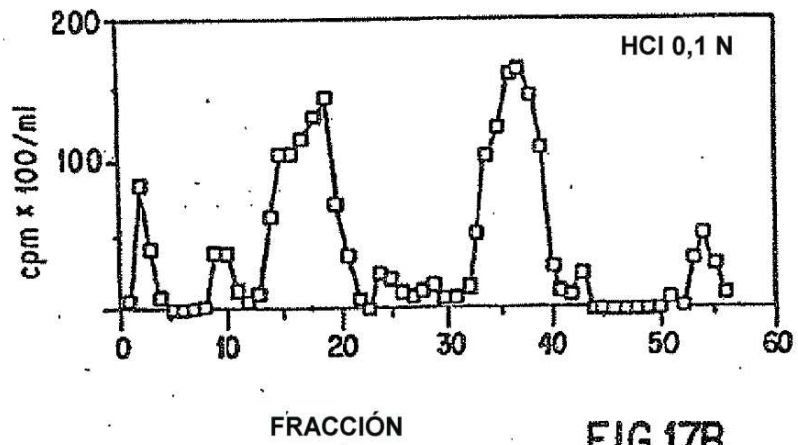
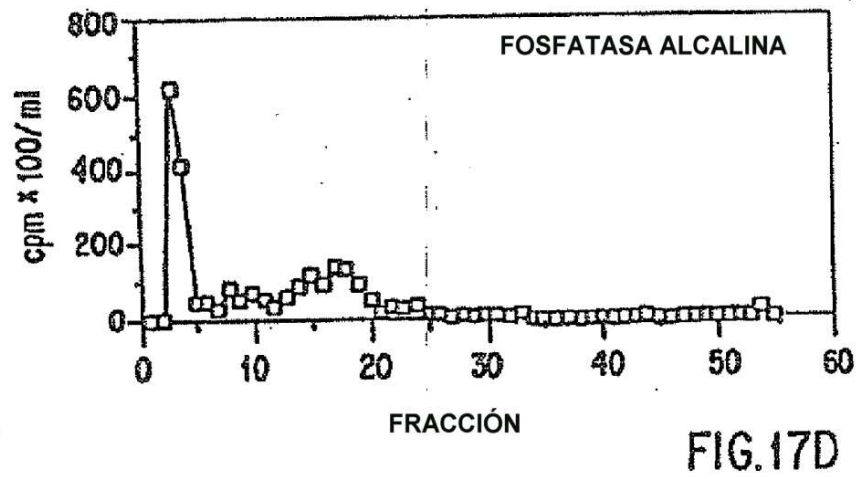
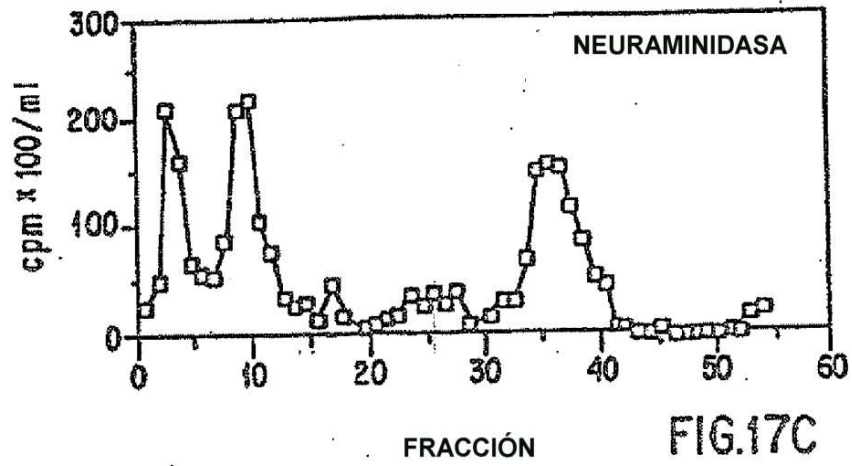


FIG. 17B



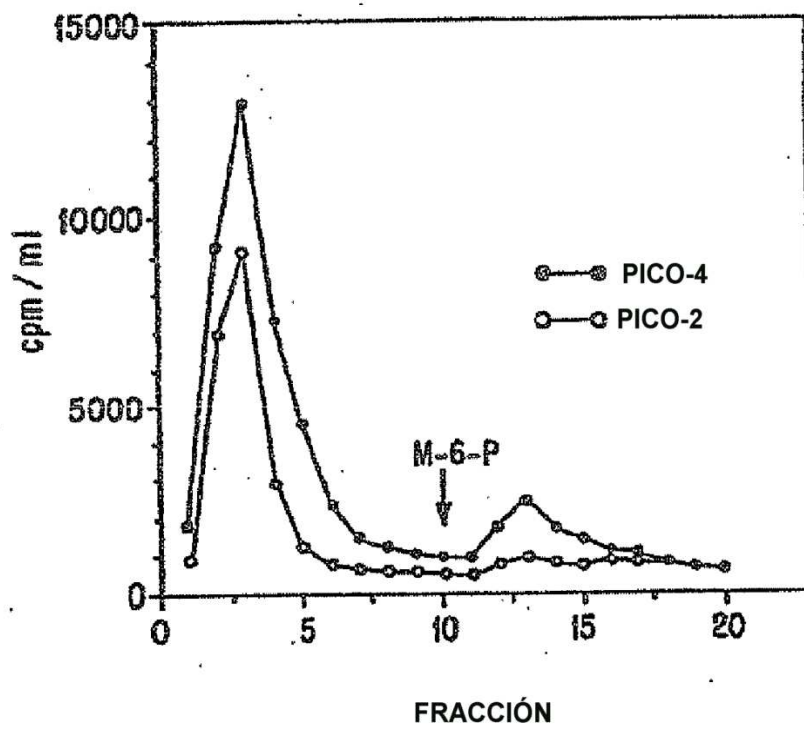


FIG.18

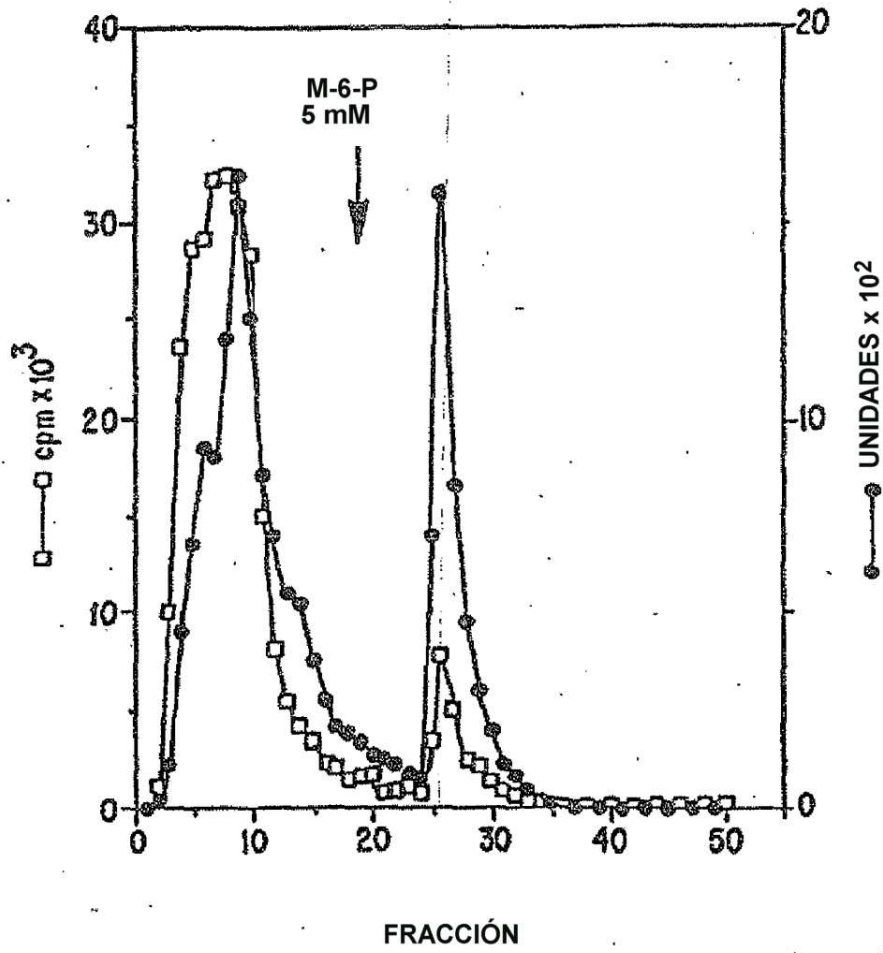
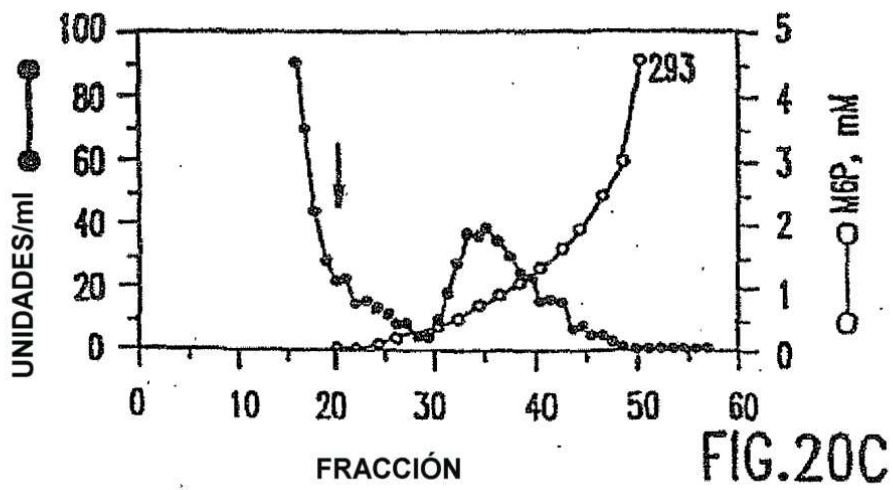
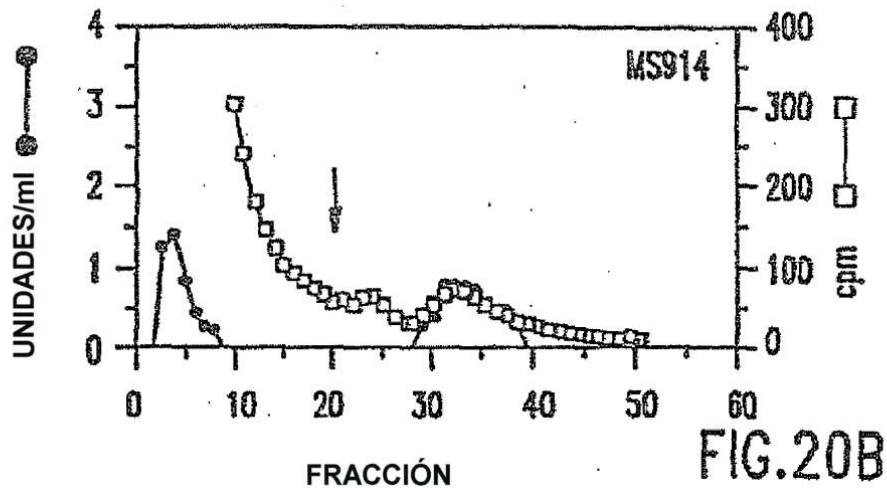
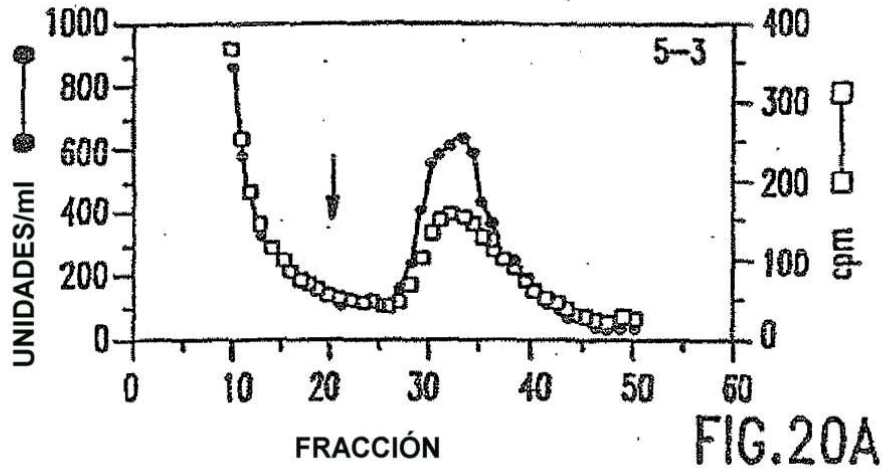


FIG. 19



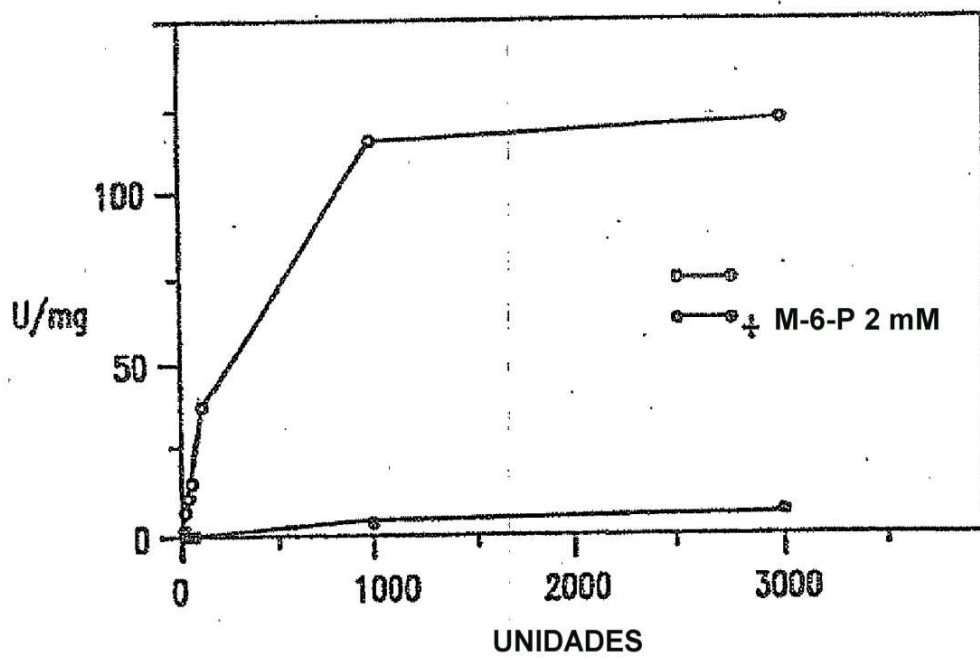


FIG.21

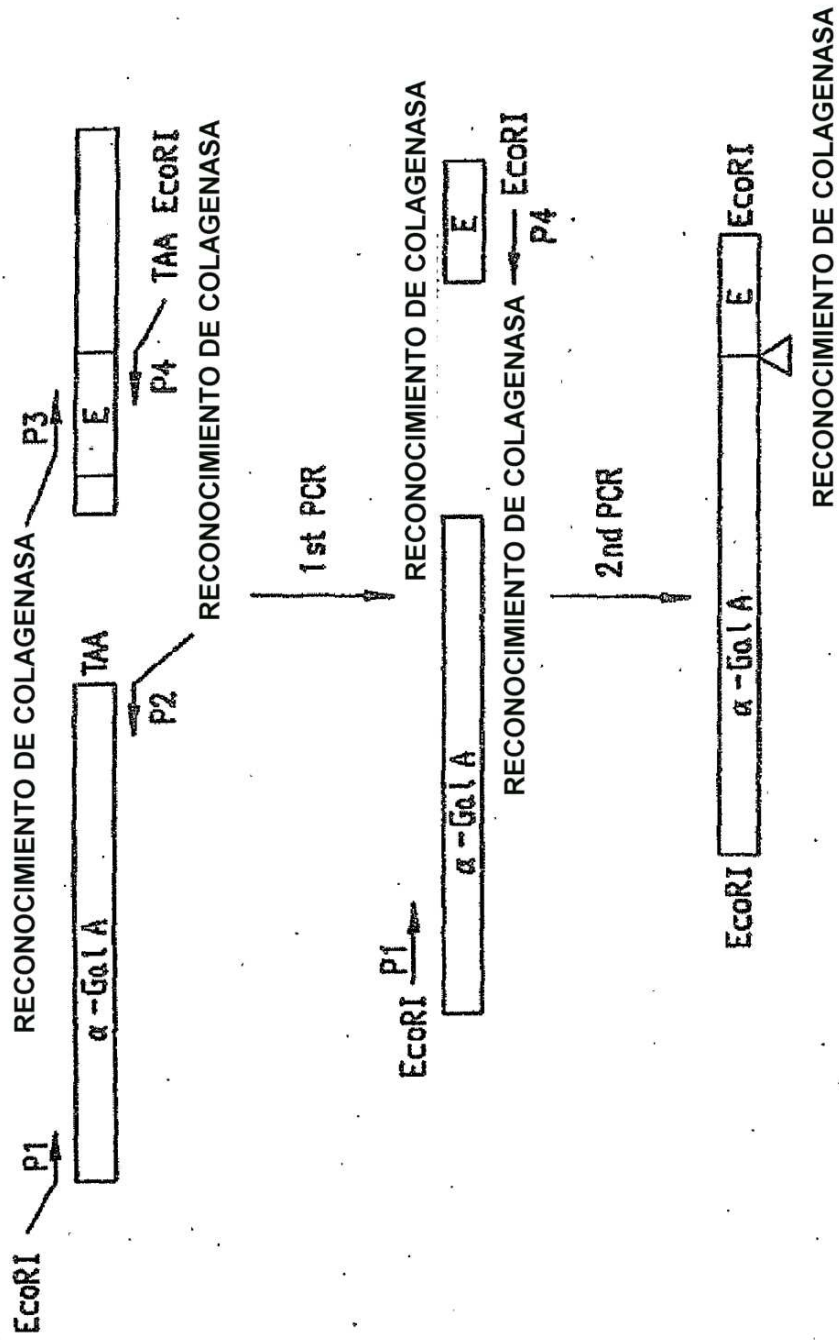


FIG.22

1191 GAA TGG ACT TCA AGG TTA AGA AGT CAC ATA AAT CCC ACA GGA ACT
 398 Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr

1226 GTT TTG CTT CAG CTA GAA AAT ACA ATG CAG ATG TCA TTA AAA GAC
 413 Val Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp

Escisión de collagenasa

1271 TTA CTT CCG GCT GGT CCG GCG CAA CAC GAT GAA GCT CAA CAA AAT
 428 Leu Leu Pro Ala Gly Pro Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn

α -Gal A

Dominio E de unión a IgG

1316 GCT TTT TAT CAA GTC TTA AAT ATG CCT AAC TTA AAT GCT GAT CAA
 443 Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln

1371 CCG AAT GGT TTT ATC CAA AGC CTT AAA GAT GAT CCA AGC CAA AGT
 450 Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser

1416 GCT AAC GTT TTA GGT GAA GCT CAA AAA CTT AAT GAC TCT CAA GCT
 473 Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala

1501 CCA AAA TAA Bam HI Eco RI
 488 Pro Lys Ter GGATCCCGAATTGGCC

FIG.23

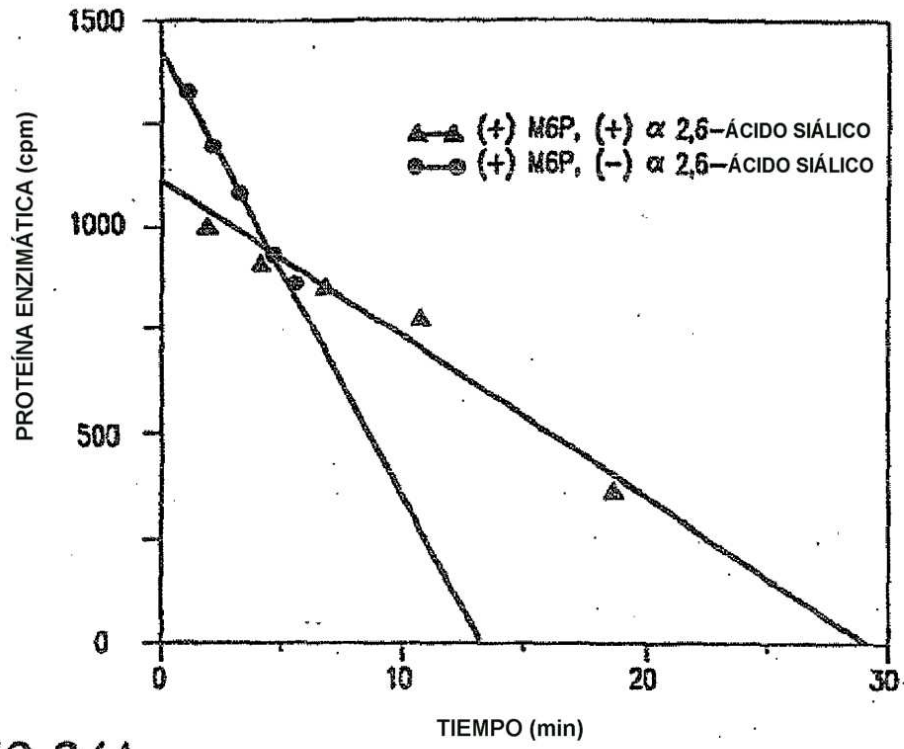


FIG.24A

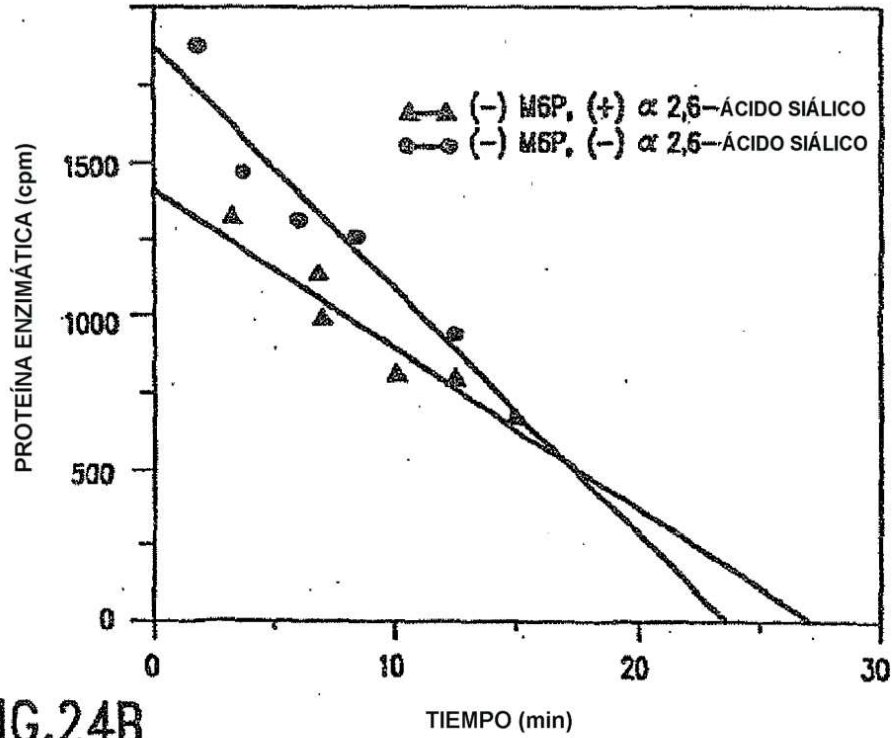


FIG.24B

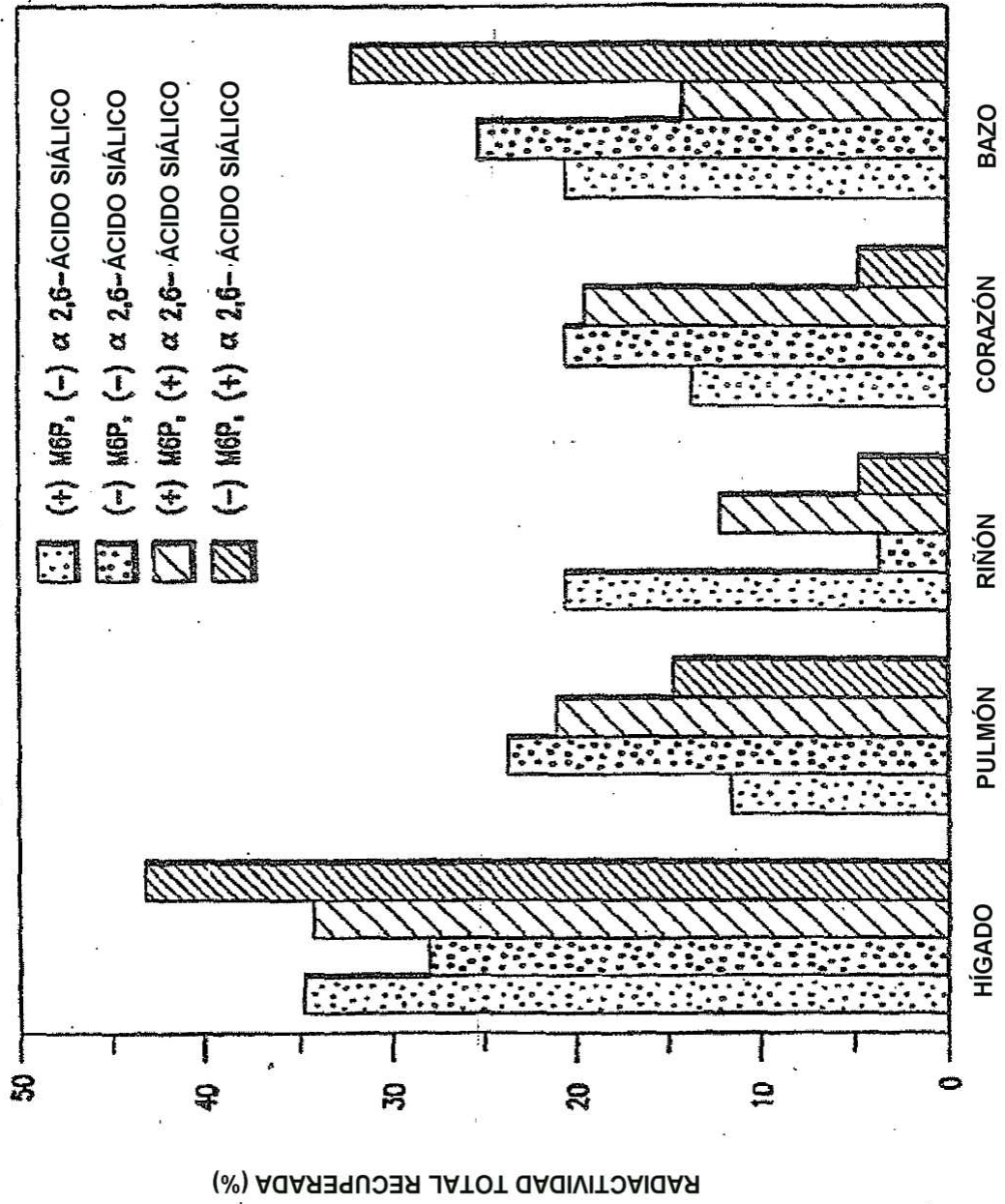


FIG.25

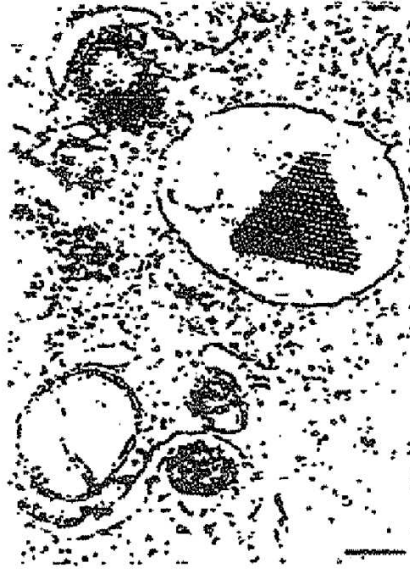


FIG. 26A



FIG. 26B



FIG. 26C

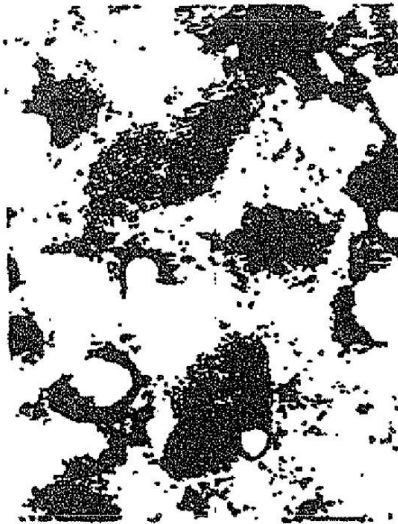


FIG. 26D

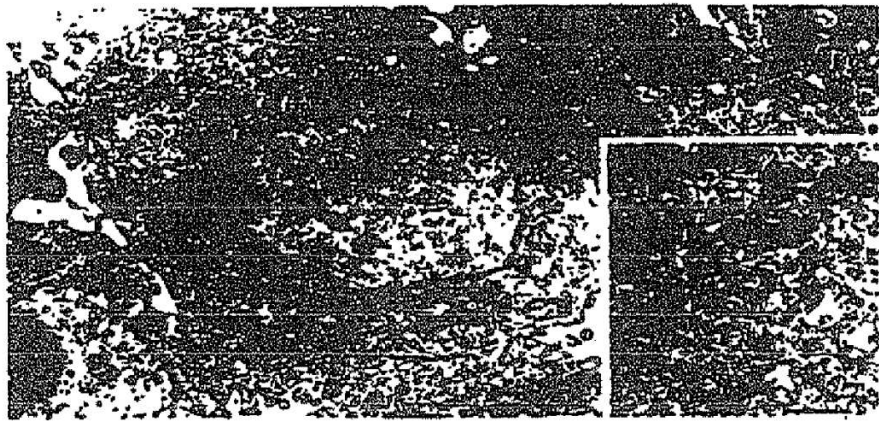


FIG.26E

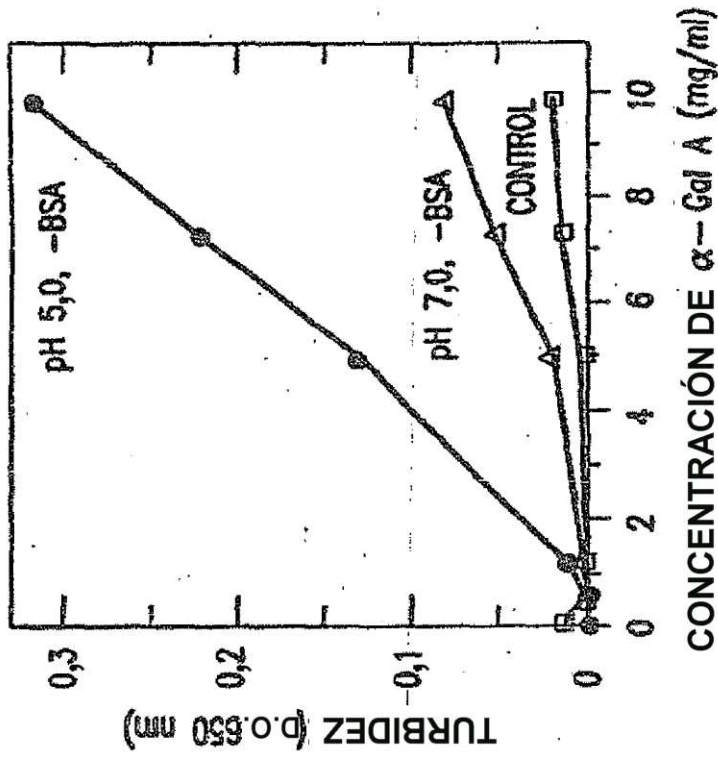


FIG.27B

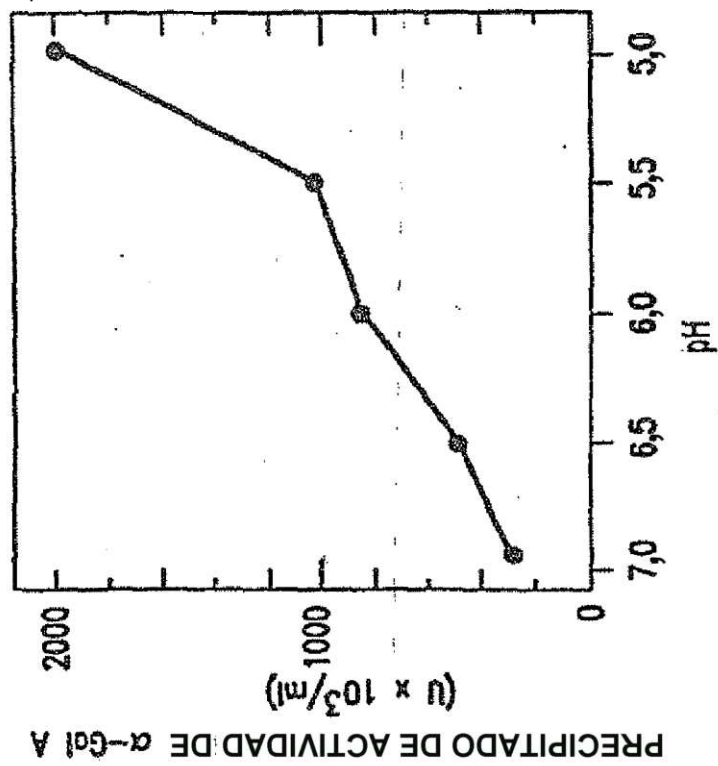


FIG.27A

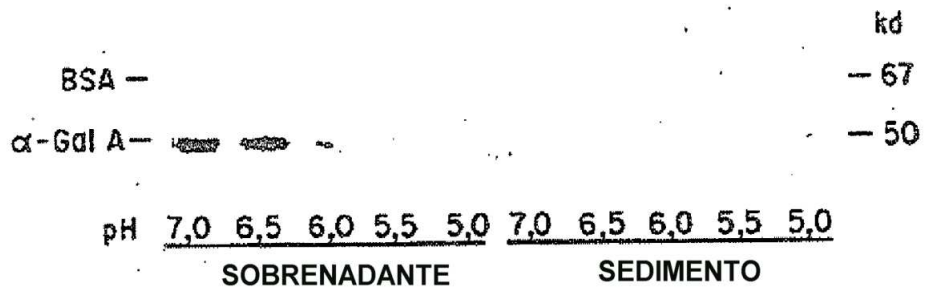


FIG.27C

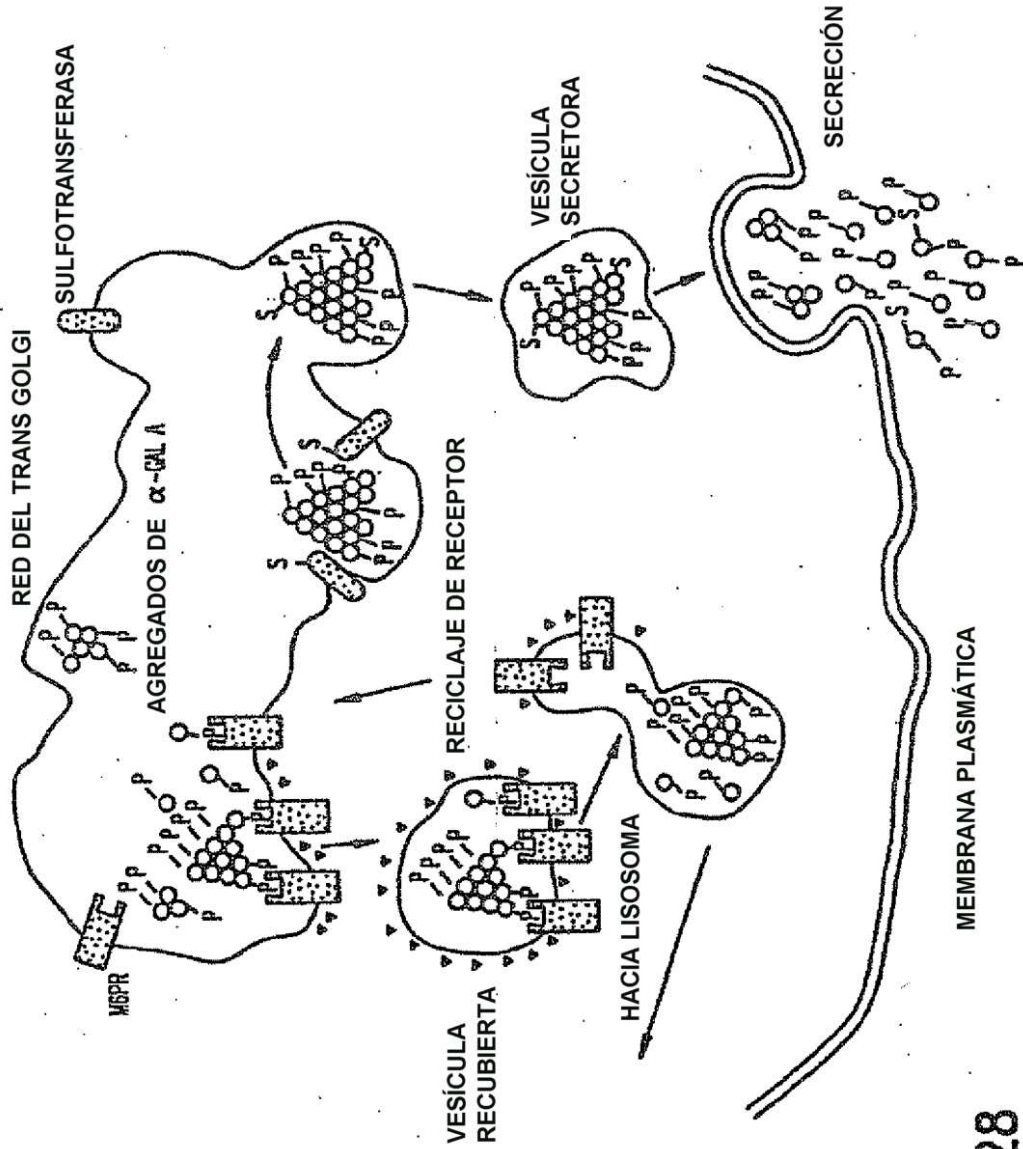


FIG.28