

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 965**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2004 E 10012376 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2333083**

54 Título: **Producción de glucocerebrosidas humana con alto contenido de manosa en cultivo vegetal**

30 Prioridad:

27.04.2003 IL 15558803

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

11.03.2014

73 Titular/es:

**PROTALIX LTD. (100.0%)
2 Snunit Street, Science Park
201000 Carmiel, IL**

72 Inventor/es:

**SHAALTIEL, YOSEPH;
BAUM, GIDEON;
HASHMUELI, SHARON;
LEWKOWICZ, AYALA y
BARTFELD, DANIEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 446 965 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

Producción de glucocerebrosidasa humana con alto contenido de manosa en cultivo vegetal

5 **Campo de la invención**

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

10 **Antecedentes de la invención**

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

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

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

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

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

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

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

55 La glucocerebrosidasa sin modificar de origen natural es una glucoproteína con cuatro cadenas de hidratos de carbono. Esta proteína no se dirige a las células fagocíticas del organismo y, por tanto, tiene un valor terapéutico limitado. En el desarrollo de la presente terapia contra la enfermedad de Gaucher, los azúcares terminales de las cadenas de hidratos de carbono de la glucocerebrosidasa se eliminan secuencialmente mediante el tratamiento con tres glucosidasas diferentes. Este tratamiento con glucosidasas produce una glucoproteína cuyos azúcares terminales consisten en restos de manosa. Como los fagocitos tienen receptores de manosa que reconocen las glucoproteínas y los glucopéptidos con cadenas de oligosacáridos que terminan en restos de manosa, la remodelación de los hidratos de carbono de la glucocerebrosidasa ha mejorado la dirección de la enzima hacia estas células [Furbish *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 673:425, (1981)].

65 Como se indica en el presente documento, la glicosilación desempeña un papel crucial en la actividad de la hGCD; por tanto, la desglucosilación de hGCD expresada en líneas celulares usando tanto tunicamicina (células Sf9) como mutaciones puntuales que suprimen todos los sitios de glicosilación (tanto células Sf9 como COS-1) produce la pérdida completa de la actividad enzimática. Además, se encontró que la hGCD expresada en *E. coli* era inactiva.

Investigaciones posteriores indicaron la relevancia de los diversos sitios de glucosilación para la actividad proteica. Además del papel de la glucosilación en la presente actividad proteica, la enzima producida a nivel comercial contiene modificaciones en las secuencias de glucano que facilitan la administración de un determinado fármaco. Las proteínas glucosiladas son remodeladas tras su extracción para incluir solamente secuencias de glucano que contienen manosa.

La enzima GCD humana contiene 4 sitios de glucosilación y 22 lisinas. La enzima recombinantemente producida (Cerezyme™) se diferencia de la enzima placentaria (Ceredasa™) en la posición 495, en la que una arginina ha sido sustituida con una histidina. Además, la composición del oligosacárido es diferente entre la GCD recombinante y la placentaria, ya que la primera tiene más restos de fucosa y *N*-acetil-glucosamina, mientras que la última conserva una cadena con alto contenido de manosa. Como se ha mencionado anteriormente, ambos tipos de GCD se tratan con tres glucosidasas diferentes (neuraminidasa, galactosidasa y P-N acetil-glucosaminidasa) para exponer las manosas terminales, lo que permite dirigirse a las células fagocíticas. En el documento US 5.549.892, se describe una preparación farmacéutica que comprende la enzima recombinantemente producida. Cabe señalar que todas las referencias mencionadas se incorporan en el presente documento por referencia como si se expusieran en su totalidad en el presente documento.

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

Otro inconveniente importante de las enzimas recombinantes de GCD existentes es su gasto, que puede ser una gran carga económica para los sistemas de atención sanitaria. El alto coste de estas enzimas recombinantes se debe a un complejo protocolo de purificación y a las cantidades relativamente elevadas del agente terapéutico requeridas para los tratamientos existentes. Existe, por tanto, la necesidad urgente de reducir el coste de la GCD de manera que esta terapia que salva vidas se pueda proporcionar de una manera más asequible a todos los que la necesitan.

Las proteínas para un uso farmacéutico se han producido tradicionalmente en sistemas de expresión de mamífero o bacterianos. En la década pasada, se desarrolló un nuevo sistema de expresión en plantas. Esta metodología utiliza agrobacterias, bacterias que pueden insertar moléculas de ADN monocatenario (T-ADN) en el genoma de las plantas. Debido a la relativa simplicidad de la introducción de genes para la producción a escala industrial de proteínas y péptidos, esta metodología cada vez es más popular como un sistema de expresión de proteínas alternativo (1).

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

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

Sumario de la invención

La técnica anterior no enseña ni sugiere ningún dispositivo, sistema o método para la producción selectiva de proteínas glucosiladas en cultivo vegetal. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere ningún dispositivo, sistema o método para la producción de proteínas con alto contenido de manosa en cultivo vegetal. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere ningún dispositivo, sistema o método para la producción de proteínas en cultivo vegetal a través del retículo endoplasmático (RE). La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere ningún dispositivo, sistema o método para la producción de proteínas en cultivo vegetal a través del retículo endoplasmático (RE) evitando, a la vez, el aparato de Golgi. La técnica anterior tampoco enseña ni sugiere ningún dispositivo, sistema o método para la producción de proteínas en cultivo vegetal usando una señal del RE para evitar el aparato de Golgi.

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

- Cabe señalar que la expresión “cultivo vegetal”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier tipo de célula vegetal transgénica y/o modificada por ingeniería genética de otro modo que se obtiene en cultivo. La modificación por ingeniería genética puede ser opcionalmente permanente o transitoria. Preferentemente, el cultivo muestra células que no se ensamblan formando una planta completa, de modo que falta al menos una estructura biológica de una planta. Opcional y preferentemente, el cultivo puede mostrar una pluralidad de tipos diferentes de células vegetales, pero preferentemente el cultivo ofrece un tipo particular de célula vegetal. Cabe señalar que opcionalmente los cultivos vegetales que muestran un determinado tipo de célula vegetal pueden proceder originariamente de una pluralidad de diferentes tipos de dichas células vegetales.
- Las células vegetales se pueden cultivar de acuerdo con cualquier tipo de método de cultivo adecuado que incluye, pero sin limitación, el cultivo sobre una superficie sólida (tal como, por ejemplo, un recipiente o placa de cultivo de plástico) o en suspensión.
- Más particularmente, la invención se refiere a células huésped, particularmente células de zanahoria suspendidas transgénicas, vectores y métodos para la expresión y producción de alto rendimiento de glucocerebrosidasa (GCD) humana con alto contenido de manosa biológicamente activa que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa. La invención proporciona además composiciones para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico.
- La presente invención también es de células huésped que comprenden nuevas composiciones de vector que permiten la producción eficaz de genes que codifican la GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa.
- Así pues, la presente invención resuelve la necesidad que se tenía desde hace tiempo de una tecnología económicamente viable para la producción de proteínas que tuvieran determinados requisitos de glucosilación, tales como la glucosilación con alto contenido de manosa de enzimas lisosómicas tales como, por ejemplo, la GCD. La presente invención puede resolver esta necesidad de hace tiempo usando el cultivo de células vegetales.
- Con el fin de explicar la presente invención en mayor profundidad, ahora se proporciona una breve explicación de la ruta biosintética de las proteínas con alto contenido de manosa. La ruta de biosíntesis básica de los glucanos ligados a N con alto contenido de manosa y complejos está altamente conservada entre todos los eucariotas. La biosíntesis empieza en el retículo endoplasmático (RE) con la transferencia del precursor del glucano de un vehículo de lípido de dolicol a un resto de Asn específico sobre la proteína por la oligosacaril transferasa. El precursor es modificado posteriormente en el RE por las glucosidasas I y II y una hipotética manosidasa, produciendo las estructuras con alto contenido de manosa, de manera similar al proceso producido en los mamíferos.
- En el aparato de Golgi, se producen otras modificaciones de la secuencia del glucano hacia estructuras complejas e híbridas. Dichas modificaciones incluyen la eliminación de uno de los cuatro restos de manosa por parte de la α -manosidasa I, la adición de un resto de *N*-acetilglucosamina, la eliminación de los dos restos de manosa adicionales por parte de la α -manosidasa II, la adición de *N*-acetilglucosamina, pudiéndose añadir opcionalmente, en esta etapa, restos de xilosa y fucosa para dar glucanos ligados a N específicos de las plantas. Tras la transferencia de la xilosa y fucosa al núcleo, los *N*-glucanos de tipo complejo se pueden seguir procesando mediante la adición de fucosa y galactosa terminal. Se pueden producir otras modificaciones durante el transporte de las glucoproteínas.
- Actualmente, se usan varios enfoques de la técnica anterior para controlar y diseñar a medida la glucosilación de proteínas en plantas, teniendo todos ellos deficiencias significativas, particularmente en comparación con la presente invención. Una estrategia consiste en modificaciones globales, tales como la inhibición completa de la glucosilación o la eliminación de sitios de glucosilación de la cadena de péptidos. Sin embargo, este enfoque puede producir defectos estructurales. Otro enfoque implica la inactivación e introducción de enzimas de procesamiento de hidratos de carbono específicas. De nuevo, este enfoque resulta complicado y también puede tener efectos perjudiciales sobre las propias células vegetales.
- La presente invención supera estas deficiencias de los enfoques de la técnica anterior usando una señal de RE y/o bloqueando la secreción del RE hacia el aparato de Golgi.
- Como se ha indicado anteriormente, las proteínas transportadas por el sistema de endomembrana pasan primero al retículo endoplasmático. La señal de transporte necesaria para esta etapa se representa por una secuencia señal en el extremo N de la molécula, el denominado péptido señal. Tan pronto como este péptido señal ha cumplido su función, que consiste en insertar la proteína precursora unida a él en el retículo endoplasmático, se disgrega proteolíticamente de la proteína precursora. En virtud de su función específica, este tipo de secuencia de péptido señal se ha conservado a un alto grado durante la evolución en todas las células vivas, independientemente de si son bacterias, levaduras, hongos, animales o plantas.
- Muchas proteínas vegetales, que se insertan en el retículo endoplasmático en virtud del péptido señal, no residen en el RE, sino que son transportadas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y continúan circulando del aparato de Golgi a las vacuolas. Una clase de dichas señales de clasificación para esta circulación son señales que

residen en la parte del extremo C de la proteína precursora [Neuhaus y Rogers, (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:127-144]. Se espera que las proteínas que contienen tanto un péptido señal del extremo N para la inserción en el retículo endoplasmático como una señal que se dirige a las vacuolas del extremo C contengan glucanos complejos, que están unidos a ellas en el aparato de Golgi [Lerouge *et al.*, (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:31-48]. La naturaleza de dichas señales de clasificación del extremo C puede variar muy ampliamente. El documento US 6.054.637 describe fragmentos de péptidos obtenidos de la región de quitinasa básica del tabaco, que es una proteína vacuolar que actúa como péptidos que se dirigen a las vacuolas. Un ejemplo de una proteína vacuolar que contiene una señal que se dirige al extremo C y glucanos complejos es la proteína de almacenamiento faseolina de las semillas de judía [Frigerio *et al.*, (1998) *Plant Cell* 10:1031-1042; Frigerio *et al.*, (2001) *Plant Cell* 13:1109-1126].

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

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped vegetal que produce GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa. Esta célula puede transformarse o transfectarse con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifique esta proteína de interés o con un vector de expresión que comprenda la molécula de ácido nucleico. Dicha molécula de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la anterior proteína de interés operativamente ligada a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige a las vacuolas de SEC ID N° 2. Además, la primera secuencia de ácido nucleico puede estar opcionalmente operativamente ligada a una tercera secuencia de ácido nucleico que codifique un péptido señal que se dirija al RE (retículo endoplasmático). La célula huésped de la invención se caracteriza porque la proteína de interés es producida por la célula en una forma altamente manosilada.

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

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

En otra realización, la molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa que está ligada operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige a las vacuolas derivado del gen de quitinasa básica A del tabaco que tiene la SEC ID N°: 2. Este péptido señal vacuolar tiene la secuencia de aminoácidos indicada por SEC ID N°: 2. Además, la primera secuencia de ácido nucleico puede estar opcionalmente ligada en un enlace operable con una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige al RE (retículo endoplasmático) indicada por la SEC ID N°: 1. En una realización, la molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende además un promotor que es funcional en células vegetales. Este promotor debería estar operativamente ligado a la molécula recombinante de la invención.

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

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

Dicha proteína glucocerebrosidasa (GCD) con alto contenido de manosa es la glucocerebrosidasa (GCD) humana que tiene actividad de la glucocerebrosidasa. De aquí en adelante, a menos que se indique lo contrario, GCD, rGCD, rhGCD recombinantes se refieren todas a diversas formas de GCD humana recombinante.

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

Por lo tanto, de acuerdo con otras realizaciones preferidas de la presente invención, se proporciona hGCD adecuadamente glucosilada controlando la expresión de hGCD en cultivo de células vegetales, proporcionándose una señal de RE.

5 La hGCD anterior tiene al menos una cadena de oligosacáridos que comprende un resto de manosa expuesto para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Gaucher.

10 En una realización particular más, esta célula huésped preferida es transformada o transfectada por una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende además un promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, un terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* y el elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico del tabaco). De acuerdo con una realización preferida, esta molécula de ácido nucleico recombinante comprende la secuencia de ácido nucleico sustancialmente indicada por la SEC ID N°: 13 y codifica una GCD con alto contenido de manosa que tiene la secuencia de aminoácidos sustancialmente indicada por la SEC ID N°: 14.

15 Se ha de apreciar que la presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima lisosómica biológicamente activa, que es GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa. De ahí que el vector de expresión de la invención comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique una glucocerebrosidasa humana (GCD) con alto contenido de manosa biológicamente activa. Preferentemente, este vector de expresión preferido comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que tiene la secuencia de ácido nucleico sustancialmente indicada por la SEC ID N°: 13.

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

25 Esta proteína con alto contenido de manosa es una enzima lisosómica con alto contenido de manosa biológicamente activa que es glucocerebrosidasa humana (GCD) que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa.

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

35 De acuerdo con una realización preferida, la GCD humana recombinante de la invención se pueden unir a un receptor de manosa sobre una célula diana en un sitio diana. Preferentemente, este sitio puede estar dentro de un sujeto que padezca una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

Cabe señalar que la enzima lisosómica recombinante tiene una alta afinidad por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica natural por la célula diana. En una realización específica, la célula diana del sitio diana puede ser una célula de Kupffer del hígado del sujeto.

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

45 Esta enzima recombinante anterior se puede unir a un receptor de manosa sobre una célula diana en un sitio diana. Más particularmente, la enzima recombinante producida tiene una alta afinidad por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica natural por la célula diana. Por consiguiente, la célula diana del sitio diana puede ser célula de Kupffer del hígado del sujeto.

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

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

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

65

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

- 5 Por consiguiente, esta enzima lisosómica biológicamente activa es una glucocerebrosidasa (GCD) humana con alto contenido de manosa biológicamente activa según lo definido por la invención.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una célula huésped que produce una proteína con alto contenido de manosa recombinante que comprende un polinucleótido que codifica la proteína recombinante y una
10 señal para hacer que la proteína recombinante se produzca como una proteína con alto contenido de manosa. Preferentemente, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés operativamente ligada a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. Opcionalmente, el péptido señal comprende un péptido señal que se dirige al RE (retículo endoplasmático). El polinucleótido comprende además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se
15 dirige a las vacuolas.

La señal hace que la proteína recombinante se dirija hacia el RE. Más preferentemente, la señal comprende un péptido señal que hace que la proteína recombinante se dirija hacia el RE. Preferentemente, el polinucleótido
20 comprende un segmento de ácido nucleico que codifica el péptido señal.

Opcional y preferentemente, la señal hace que la proteína recombinante evite el aparato de Golgi. Preferentemente, la señal comprende un péptido señal que hace que la proteína recombinante no se dirija al aparato Golgi. Más preferentemente, el polinucleótido comprende un segmento de ácido nucleico que codifica el péptido señal.

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

El polinucleótido recombinante comprende una primera secuencia de ácido nucleico que está ligada operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige a las vacuolas derivado del gen de la quitinasa básica A del tabaco, péptido señal vacuolar que tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N°: 2, en el que la primera secuencia de ácido nucleico está opcionalmente además operativamente ligada a una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige al RE (retículo
35 endoplasmático) que se indica por la SEC ID N°: 1.

Más preferentemente, el polinucleótido recombinante comprende además un promotor que es funcional en células vegetales, en el que el promotor está operativamente ligado a la molécula recombinante.
40

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

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

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

Preferentemente, la GCD comprende la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N°: 8, codificada por la secuencia de ácido nucleico indicada por la SEC ID N°: 7.

55 Más preferentemente, la célula se transforma o transfecta con un polinucleótido recombinante o con un vector de expresión que comprende la molécula, polinucleótido recombinante que comprende además un promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, un terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, y el elemento regulador es el elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico del tabaco), y que tiene la secuencia de ácido nucleico sustancialmente indicada por la SEC ID N°: 13 que codifica la GCD que tiene la secuencia de aminoácidos sustancialmente indicada por la SEC ID N°: 14.
60

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

65 Se proporciona una proteína GCA humana con alto contenido de manosa recombinante que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa producida en cultivo de células vegetales. Preferentemente, la proteína muestra un péptido

señal vegetal para dirigir una proteína al RE.

Más preferentemente, el péptido señal vegetal comprende un péptido para dirigir una proteína al RE en un cultivo de células vegetales de raíz. Lo más preferentemente, el cultivo de células vegetales de raíz comprende células de zanahoria.

De acuerdo con otras realizaciones preferidas más, se proporciona el uso de un cultivo de células vegetales para producir una GCD con alto contenido de manosa humana que tenga actividad catalítica de la glucocerebrosidasa.

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

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

El método se realiza con la célula huésped como se ha descrito previamente.

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

La enzima lisosómica es glucocerebrosidasa (GCD) que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa. Lo más preferentemente, la célula diana del sitio diana es célula de Kupffer del hígado del sujeto.

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

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

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

La enzima recombinante de la invención se puede unir a un receptor de manosa sobre una célula diana en un sitio diana dentro de un sujeto. Más preferentemente, la enzima lisosómica recombinante de la invención tiene una afinidad elevada por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica natural por la célula diana. La enzima lisosómica es glucocerebrosidasa (GCD) que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa.

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

De acuerdo con otras realizaciones más, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende como principio activo una enzima lisosómica con alto contenido de manosa biológicamente activa recombinante como se ha descrito anteriormente, composición que opcionalmente comprende además diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La enfermedad de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Gaucher. La enzima lisosómica recombinante es una glucocerebrosidasa (GCD) humana con alto contenido de manosa biológicamente activa que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa.

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

La invención se describirá además mediante las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

La invención se describe en el presente documento, meramente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1A-1B

1A muestra el casete de expresión resultante que comprende el promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico del tabaco), señal dirigida al RE, la

secuencia de GCD humana (también indicada por la SEC ID N°: 7), señal vacuolar y secuencia del terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

1B muestra un mapa esquemático de la estructura del plásmido pGreenII.

5 La Figura 2 muestra el análisis de transferencia Western de extractos de célula transformados por hGCD usando anticuerpo específico anti-hGCD. Se usó Cerezyme convencional (carril 1) como control positivo, se usó callo sin transformar como control negativo (carril 2), se muestran diversos extractos de callos seleccionados en los carriles 3-8.

10 La Figura 3A-3C muestra la primera etapa de purificación de rhGCD sobre una resina de intercambio catiónico fuerte (soporte Macro-Prep High-S, Bio-Rad), empaquetada en una columna XK (2,6 x 20 cm). La columna se integró con un sistema AKTA-Prime (Amersham Pharmacia Biotech) que permite la monitorización de la conductividad, el pH y la absorbancia a 280 nm. La elución de la rh-GCD se obtuvo con tampón de equilibrio que contenía NaCl 600 mM. La Fig. 3A representa una ejecución convencional de esta etapa de purificación. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron mediante un ensayo de la actividad enzimática, como se muestra mediante la Fig. 3B, y se agruparon los tubos que presentaron actividad enzimática (en el pico de elución). La Fig. 3C muestra la tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas para la actividad.

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 7 muestra estructuras de glucosilación para rGCD de acuerdo con la presente invención.

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

60 La presente invención describe en el presente documento un sistema de expresión vegetal basado en células vegetales transgénicas, que son preferentemente células de raíz, opcional y preferentemente cultivadas en suspensión. Este sistema de expresión está particularmente diseñado para la producción eficaz de GCD humana que tenga actividad glucocerebrosidasa. La expresión "con alto contenido de manosa" incluye la glucosilación que tiene al menos un resto de manosa expuesto.

65

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que produce GCD humana que tiene actividad glucocerebrosidasa. Preferentemente, la proteína recombinante presenta un péptido señal del RE (retículo endoplasmático), más preferentemente un péptido señal dirigido al RE. Como alternativa o además, la proteína recombinante presenta una señal que hace que la proteína evite al aparato de Golgi. La señal permite preferentemente que esta proteína recombinante presente glucosilación con alto contenido de manosa, más preferentemente conservando dicha glucosilación, y lo más preferentemente dirigiéndose al RE y/o evitando el aparato Golgi. Como se describe en mayor detalle en el presente documento, dicha señal se implementa como un péptido señal de SEC ID N°: 2, que forma parte de la secuencia proteica. Cabe señalar que la señal es una señal de dirección. Los péptidos señal dirigidos al RE son muy conocidos en la técnica; son péptidos señal del extremo N. Opcionalmente, se puede usar cualquier péptido señal dirigido al RE adecuado con la presente invención.

Una célula huésped vegetal de acuerdo con la presente invención puede transformarse o transfectarse opcionalmente (permanente y/o transitoriamente) con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa o con un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico. Dicha molécula de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa operativamente ligada a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige a las vacuolas de SEC ID N°: 2. Cabe señalar que, como se usa en el presente documento, la expresión "operativamente" ligado no se refiere necesariamente a un enlace físico. La primera secuencia de ácido nucleico puede opcional y preferentemente estar además operativamente ligada a una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal dirigido al RE (retículo endoplasmático). La célula huésped de la invención se caracteriza porque la proteína de interés es producida por la célula en una forma que incluye al menos un resto de manosa expuesto, pero es preferentemente una forma altamente manosilada.

"Células", "células huésped" o "células huésped recombinantes" es un término y dos expresiones usados indistintamente en el presente documento. Se entiende que dichos términos y expresiones no solo se refieren a determinadas células del sujeto, sino a la progenie o la posible progenie de dicha célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en la generación sucesiva debido tanto a la mutación como a influencias medioambientales, dicha progenie puede, en realidad, no ser idéntica a la célula parental, y seguir estando incluida dentro del alcance del término o la expresión usada en el presente documento. "Célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a células que pueden transformarse recombinantemente con ADN desnudo o vectores de expresión construidos usando técnicas de ADN recombinante. Como se usa en el presente documento, el término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, ADN desnudo o un vector de expresión, en una célula receptora mediante transferencia génica mediada por ácido nucleico. "Transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que se cambia un genotipo de célula como resultado de la captación celular de ADN o ARN exógeno y, por ejemplo, la célula transformada expresa una forma recombinante de la proteína deseada.

Se ha de apreciar que se prevé una resistencia a un fármaco u otro marcador de selección, en parte, para facilitar la selección de los transformantes. Además, la presencia de un marcador de selección, tal como un marcador de resistencia a fármacos, puede servir para evitar que los microorganismos contaminantes se multipliquen en el medio de cultivo. Dicho cultivo puro de la célula huésped transformada se obtendría cultivando las células en condiciones que se requieren para la supervivencia del fenotipo inducido.

Como se ha indicado anteriormente, las células huésped vegetales de la invención pueden transfectarse o transformarse con una molécula de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando corresponda, ácido ribonucleico (ARN). También se ha de entender que las expresiones incluyen, como equivalentes, análogos tanto de ARN como de ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos y, cuando sea aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tal como sentido o antisentido) y bicatenarios.

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

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

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

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

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

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

Los vectores de expresión o moléculas de ácidos nucleicos recombinantes usados para transfectar o transformar las células huésped de la invención pueden modificarse más de acuerdo con métodos conocidos para los expertos en la materia para añadir, eliminar o modificar de otro modo secuencias señal de péptidos para alterar la escisión del péptido señal, o para aumentar o cambiar la dirección de la enzima lisosómica expresada mediante el sistema de endomembrana vegetal. La construcción de expresión se modifica por ingeniería genética específicamente para dirigir la enzima lisosómica hacia una ubicación vacuolar.

El vector de expresión o la molécula de ácido nucleico recombinante se modifica por ingeniería genética para incorporar una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de SEC ID N°: 2 que dirige la enzima lisosómica a la vacuola vegetal.

La molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa que está ligada operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que se dirige a las vacuolas derivado del gen de la quitinasa básica A del tabaco. Este péptido señal vacuolar tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N°: 2. La primera secuencia de ácido nucleico puede estar además opcionalmente ligada operativamente a una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal dirigido hacia el RE (retículo endoplasmático) indicado por la SEC ID N°: 1. En una realización, la molécula de ácido nucleico recombinante comprendida dentro de la célula huésped de la invención comprende además un promotor que es funcional en células vegetales. Este promotor debería estar operativamente ligado a la molécula recombinante de la invención.

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

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

Los elementos reguladores que se pueden usar en las construcciones de expresión incluyen promotores que pueden ser bien heterólogos u homólogos a la célula vegetal. El promotor puede ser un promotor vegetal o un promotor no vegetal que puede activar altos niveles transcripción de una secuencia ligada en células vegetales y plantas. Los ejemplos no limitantes de promotores vegetales que se pueden usar eficazmente en la práctica de la invención incluyen el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) ^{35S}, rbcS, el promotor para la proteína de unión a la clorofila a/b, Adh1, NOS y HMG2, o modificaciones o derivados de los mismos. El promotor puede ser bien constitutivo o

inducible. Por ejemplo, y no a modo de limitación, un promotor inducible puede ser un promotor que promueva la expresión o expresión elevada de la secuencia de nucleótidos de la enzima lisosómica tras la activación mecánica de genes (MGA) de la planta, tejido vegetal o célula vegetal.

5 Los vectores de expresión usados para transfectar o transformar las células huésped de la invención se pueden modificar adicionalmente de acuerdo con métodos conocidos para los expertos en la materia para potenciar u optimizar la expresión génica heteróloga en plantas y células vegetales. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, mutar elementos reguladores de ADN para aumentar la fuerza del promotor o alterar la proteína de interés.

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

25 Además, en una realización particular, esta célula huésped vegetal preferida es transformada o transfectada por una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende además un promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, que tiene preferentemente la secuencia de ácido nucleico indicada por la SEC ID N°: 9, un terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, preferentemente, que tiene la secuencia de ácido nucleico indicada por la SEC ID N°: 12, y elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico del tabaco). De acuerdo con una realización preferida, este molécula de ácido nucleico recombinante comprende la secuencia de ácido nucleico indicada sustancialmente por la SEC ID N°: 13 y codifica una GCD con alto contenido de manosa que tiene la secuencia de aminoácidos indicada sustancialmente por la SEC ID N°: 14.

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

40 Puede haber un casete de expresión comprendido dentro del vector de expresión anteriormente descrito.

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

50 La GCD humana recombinante que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa se puede unir a un receptor de manosa sobre una célula diana, en un sitio diana. Este sitio puede estar dentro de un sujeto que padezca la enfermedad de Gaucher.

Opcionalmente y más preferentemente, la enzima lisosómica recombinante como se ha definido anteriormente tiene una elevada afinidad por la célula diana en comparación con la afinidad correspondiente de una enzima lisosómica natural por la célula diana. En una realización específica, la célula diana del sitio diana puede ser una célula de Kupffer del hígado del sujeto.

60 Opcionalmente, la proteína recombinante puede ser producida por células vegetales de acuerdo con la presente invención mediante el cultivo en un dispositivo descrito con respecto a la patente de EE.UU. N° 6.391.638, concedida el 21 de mayo de 2002 e incorporada por el presente documento por referencia como si se expusiera completamente en el presente documento. Las condiciones para cultivar células vegetales en suspensión con este dispositivo se describen con respecto a la solicitud de patente de EE.UU. titulada "CELL/TISSUE CULTURING DEVICE, SYSTEM AND METHOD" por uno de los presentes inventores y en copropiedad con la presente solicitud, que se presentó el mismo día que la presente solicitud.

65 Los ejemplos muestran que una h-GCD recombinante producida por la invención se unió inesperadamente a la membrana interna de las células de zanahoria transformadas de la invención y no fue secretada al medio. La rh-

GCD soluble se puede separar de residuos de células y otro componente insoluble de acuerdo con medios conocidos en la técnica tales como filtración o precipitación. Por ejemplo, tras un ciclo de congelación-descongelación, las células experimentan una rotura y liberación de las proteínas solubles intracelulares, mientras que la h-GCD sigue unida a los residuos de membrana insoluble. A continuación, se centrifugó esta mezcla de
 5 residuos solubles e insolubles de membrana y se eliminó la fracción soluble, simplificándose así la purificación. Entonces, la membrana unida h-GCD se puede disolver por rotura mecánica en presencia de un detergente suave, inhibidores de proteasa y reactivo de oxidación neutralizante. La enzima soluble se puede purificar adicionalmente usando técnicas de cromatografía tales como columnas de cromatografía de intercambio catiónico y de interacción hidrófoba. Durante la producción de rh-GCD en el biorreactor y el método de purificación, se puede determinar la
 10 identidad, el rendimiento, la pureza y la actividad enzimática de h-GCD mediante uno o más ensayos bioquímicos que incluyen, pero sin limitación, detectar la hidrólisis del sustrato enzimático o un sustrato análogo, el análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y análisis inmunológicos tales como ELISA y transferencia Western.

En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprenden”, y las variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implican la inclusión de un número entero o una etapa o un grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.
 15

Cabe señalar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.
 20

Cabe señalar que el término “tratamiento” también incluye la mejora o el alivio de una afección patológica y/o uno o más síntomas de la misma, la curación de dicha afección o la prevención de la génesis de dicha afección.

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

La enzima lisosómica usada por el método es la glucocerebrosidasa (GCD) humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa.
 35

La proteína de la presente invención se puede usar para producir una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica incluye, como principio activo de la misma, dicha proteína como se ha definido anteriormente y en las reivindicaciones y un vehículo farmacéutico aceptable. Como se usa en el presente documento, una “composición farmacéutica” se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento, tal como una proteína recombinante, con otros componentes químicos tales como fármacos tradicionales, vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de una proteína o célula a un organismo. Las composiciones farmacéuticas de la presente
 40 invención se pueden fabricar mediante procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de fijación, disolución, granulación, preparación de grageas, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.
 45

En una realización preferida, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado/a por un organismo regulador del gobierno federal o un gobierno estatal, o enumerado/a en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. De aquí en adelante, las expresiones “vehículo fisiológicamente adecuado” y “vehículo farmacéuticamente aceptable” se usan indistintamente, y se refieren a un vehículo aprobado o un diluyente que no provoca irritación significativa en un organismo, y no anula la actividad biológica ni las propiedades del conjugado administrado.
 50

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, que incluyen aquellos que proceden del petróleo, o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. También se pueden emplear soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de
 60
 65

liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína, preferentemente, en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación ha de ser adecuada para el modo de administración.

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

En "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, se pueden encontrar otras técnicas para la formulación y administración de principios activos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

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

Así pues, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.

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

Para la administración oral, los principios activos se pueden formular opcionalmente a través de administración de las células completas que producen GCD humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa de acuerdo con la presente invención. Los principios activos también se pueden formular combinando los principios activos y/o las células con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten la formulación de los principios activos de la invención en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para un uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir adyuvantes adecuados, si se desea, obteniéndose comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes de disgregación tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido gálico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de principio activo.

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

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

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

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

20 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Además, se pueden preparar suspensiones de los principios activos como suspensiones oleaginosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

30 En una realización, la composición se formula de acuerdo con métodos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada a la administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, las composiciones farmacéuticas para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Generalmente, los componentes se suministran bien por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobre en el que se indica la cantidad de agente activo. Si la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Si la composición se administra por inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes se puedan mezclar antes de la administración.

40 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

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

50 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o de fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

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

65 Las pomadas son preparaciones semisólidas normalmente basadas en petrolato u otros derivados del petróleo. La base de pomada específica que se va a usar, como será apreciado por los expertos en la materia, es aquella que proporcionará una óptima administración de los principios activos y, preferentemente, también proporcionará otras

características deseadas, por ejemplo, emoliencia o similares. Al igual que con otros excipientes o vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, XIX ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), en las páginas 1399-1404, las bases de pomada se pueden agrupar en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases en emulsión; y bases hidrosolubles. Las bases de pomada oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de pomada emulsionables, también conocidas como bases de pomada absorbentes, contienen poco o nada de agua, e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y petrolato hidrófilo. Las bases de pomada en emulsión son bien emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada hidrosolubles preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable; de nuevo, cabe hacer referencia a "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" para mayor información.

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

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

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

En las formulaciones tópicas de la invención, se pueden incluir diversos aditivos conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden usar disolventes para solubilizar ciertas sustancias de principios activos. Otros aditivos opcionales incluyen potenciadores de la permeación de la piel, opacificantes, antioxidantes, gelificantes, espesantes, estabilizadores y similares.

Las composiciones tópicas también se pueden administrar en la piel usando parches de tipo dérmicos o artículos convencionales en los que la composición de principios activos está contenida dentro de una estructura laminada que sirve de dispositivo de administración de fármaco para fijarse a la piel. En dicha estructura, la composición de principios activos está contenida en una capa, o "depósito", que se encuentra debajo de una capa de refuerzo superior. La estructura laminada puede contener un único depósito, o puede contener múltiples depósitos. En una realización, el depósito comprende una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante la administración de los principios activos. Los ejemplos de materiales adhesivos de contacto para la piel adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos y similares. El adhesivo polimérico particular seleccionado dependerá de los principios activos particulares, vehículo, etc., es decir, el adhesivo debe ser compatible con todos los componentes de la composición que contiene los principios activos. Como alternativa, el depósito que contiene los principios activos y el adhesivo de contacto para la piel están presentes como capas separadas y distintas, encontrándose el adhesivo debajo del depósito que, en este caso, puede ser bien una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente o puede ser un depósito de líquido o hidrogel, o puede adoptar alguna otra forma.

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

5 Durante el almacenamiento y antes de su uso, la estructura laminada incluye un revestimiento de liberación. Inmediatamente antes de su uso, se retira esta capa del dispositivo para exponer la superficie basal del mismo bien al depósito de principios activos o a una capa adhesiva de contacto separada, de manera que el sistema se pueda fijar a la piel. El revestimiento de liberación se debe fabricar a partir de un material impermeable a los principios activos/vehículo.

10 Dichos dispositivos se pueden fabricar usando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, por colada de una mezcla fluida de adhesivo, principios activos y vehículo sobre la capa de refuerzo, seguida de laminación del revestimiento de liberación. De manera similar, la mezcla de adhesivo puede colarse sobre el revestimiento de liberación, seguido de la laminación de la capa de refuerzo. Como alternativa, el depósito de principios activos se puede preparar en ausencia de principios activos o excipiente, y luego cargarse mediante "remojo" en una mezcla de principios activos/vehículo.

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

20 Cabe señalar que la proteína de la invención se administra preferentemente al paciente en necesidad de ella en una cantidad eficaz. Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria para alcanzar un resultado seleccionado. Por ejemplo, se puede seleccionar una cantidad eficaz de la composición de la invención para que sea útil para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el fin previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principio activo eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se esté tratando.

30 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz pertenece a las capacidades de los expertos en la materia, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

35 Para cualquier principio activo usado en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de actividad en animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones en circulación que incluya la CI_{50} determinada mediante ensayos de actividad.

40 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales experimentales, por ejemplo, determinando la CI_{50} y la DL_{50} (dosis letal que causa la muerte en el 50 % de los animales ensayados) para un determinado principio activo. Los datos obtenidos de estos ensayos de actividad y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. Por ejemplo, es posible determinar las dosis terapéuticamente eficaces adecuadas para el tratamiento de trastornos genéticos a partir de los experimentos con modelos animales de estas enfermedades.

45 La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosis pueden ser seleccionadas por cada médico en vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1).

50 La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos de modulación, denominada concentración mínima eficaz (CME). La CME variará para cada preparación, pero se puede estimar opcionalmente a partir de datos de animales completos.

55 Los intervalos de dosis también se pueden determinar usando el valor de CME. Las preparaciones se pueden administrar opcionalmente usando una pauta que mantenga los niveles en plasma por encima de la CME durante el 10-90 % del tiempo, preferentemente entre el 30 y el 90 %, y lo más preferentemente 50-90 %.

60 Dependiendo de la gravedad y de la sensibilidad de la afección que se vaya a tratar, la dosificación también puede ser una sola administración de una composición de liberación lenta descrita anteriormente en este documento, durando el curso del tratamiento de varios días a varias semanas, o hasta que se efectúe la curación o se logre la disminución del estado patológico.

65 Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria

que contengan el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado al recipiente en una forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleje la aprobación por parte del organismo de la forma de las composiciones, o administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la FDA estadounidense para la prescripción de fármacos o de un prospecto del producto autorizado. También pueden prepararse composiciones que comprenden un principio activo de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible, disponerse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

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

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

Ejemplos

Métodos experimentales:

Vectores de plásmido

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

El plásmido CE se digirió con Sall.

El extremo cohesivo de Sall se hizo romo usando el fragmento grande de ADN polimerasa I. A continuación, se digirió el plásmido con PstI y se ligó a un fragmento de ADN que codificaba la señal dirigida al RE del gen de endoquitinasa básica [*Arabidopsis thaliana*] ATGAAGACTAATCTTTTCTCTTTCTCATCTTTTCA

CTTCTCCTATCATTATCCTCGGCCGAATTC, y la señal dirigida a las vacuolas de la quitinasa A del tabaco: GATCTTTTAGTCGATACTATG se digirió con SmaI y PstI.

*pGREENII – Se obtuvo del Dr. P. Mullineaux [Roger P. Hellens *et al.*, (2000)

Plant Mol. Bio. 42:819-832]. La expresión del vector pGREEN II está controlada por el promotor ³⁵S del virus del mosaico de la coliflor, el elemento potenciador de la traducción omega del VMT (virus del mosaico del tabaco) y la secuencia del terminador de octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

ADNc

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

Construcción de plásmido de expresión

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

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

Establecimiento del callo de zanahoria y cultivos en suspensión de células

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

Transformación de células de zanahoria y aislamiento de células transformadas

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

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

14 días después de la transformación, se sembraron células de cultivo sobre medios sólidos a dilución del 3 % de hematocrito para la formación de callos de agrupaciones individuales de células. Cuando los callos individuales alcanzaron 1-2 cm de diámetro, las células se homogeneizaron en tampón de muestra SDS y los extractos de proteína resultantes se separaron sobre SDS-PAGE [Laemmli U., (1970) *Nature* 227:680-685] y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (nitrocelulosa Hybond C, 0,45 micrómetros. N° de catálogo RPN203C de Amersham Life Science). La transferencia Western para la detección de la GCD se realizó usando anticuerpos policlonales anti-hGCD (descritos más adelante en el presente documento). Los callos que expresaron niveles significativos de GCD se expandieron y se transfirieron para crecer en medios líquidos para el aumento a escala, la purificación de proteínas y el análisis.

Preparación de anticuerpos policlonales

Se suspendieron 75 microgramos de GCD recombinante (Cerezyme™) en 3 ml de adyuvante completo de Freund y se inyectaron a cada uno de dos conejos. Se administró a cada conejo una inyección de refuerzo después de dos semanas. Aproximadamente 10 días después de la inyección de refuerzo, se sangraron los conejos y, de nuevo, a intervalos de una semana hasta que empezó a disminuir el título de los anticuerpos. Tras retirarlo del coágulo, se repartió el suero en alícuotas y se almacenó a -20 °C.

Aumento a escala del crecimiento de cultivos en un biorreactor

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

El cultivo celular en suspensión se preparó subcultivando el callo transformado en un medio líquido MSD (Murashige & Skoog (1962) que contenía 0,2 mg/l de ácido 2,4-dicloroacético), como es ampliamente conocido en la técnica. Las células en suspensión se cultivaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml (el volumen de trabajo empieza con 25 ml y, tras 7 días, aumenta hasta 50 ml) a 25 °C con una velocidad de agitación de 60 rpm. Posteriormente, se aumentó el volumen de cultivo celular hasta un Erlenmeyer de 1 l mediante la adición de volumen de trabajo de hasta 300 ml en las mismas condiciones. El inóculo del biorreactor pequeño (10 l) [véase el documento WO98/13469] que contenía 4 l de medio MSD se obtuvo mediante la adición de 400 ml de células en suspensión derivadas de dos Erlenmeyer de 1 l que se cultivaron durante siete días. Después de una semana de cultivo a 25 °C con 1 lpm de flujo de aire, se añadió medio MDS hasta 10 l y se prosiguió con el cultivo en las mismas condiciones. Tras cinco días más de cultivo, se cosechó la mayoría de las células y se recogió pasando el medio de células a través de una red de 80 µm. Se exprimió más medio y se almacenó la torta de concentrado de células a -70 °C.

Se pueden encontrar más detalles del dispositivo biorreactor con respecto a la patente de EE.UU. n° 6.391.638 concedida el 21 de mayo de 2002.

Purificación de proteínas

Para separar el medio de la GCD insoluble, se descongeló la torta de células congeladas que contenía aproximadamente 100 g de células en peso húmedo, tras lo que se centrifugaron las células descongeladas a 17.000 x g durante 20 min a 4 °C. Se lavaron los materiales insolubles y las células intactas mediante la resuspensión en 100 ml de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM) y luego se

precipitaron por centrifugación a 17.000 g durante 20 min a 4 °C. Se extrajo la rh-GCD (GCD humana recombinante) y se solubilizó mediante homogeneización del sedimento en 200 ml de tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM, PMSF 1 mM, ácido ascórbico 20 mM, 3,8 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), DTT 1 mM y Triton-x-100 al 1 %). A continuación, se agitó el homogeneizado durante 30 min a temperatura ambiente y se aclaró por centrifugación a 17.000 x g durante 20 min a 4 °C. Se desechó el sedimento y se ajustó el pH del sobrenadante a pH 5,5 mediante la adición de ácido cítrico concentrado. Se aclaró la turbidez generada tras ajustar el pH mediante centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente.

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

La etapa de purificación final se realizó sobre una columna XK (1,6 x 20 cm) empaquetada con 8 ml de resina de interacción hidrófoba (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, Tosoh Corp.). Se equilibró la resina en tampón citrato 10 mM a pH 6,0 que contenía etanol al 5 %. Se cargó la agrupación de elución de GCD de la columna anterior a 6 ml/min, tras lo que se lavó con tampón de equilibrio hasta que el absorbente de UV alcanzó la línea basal. Se eluyó la GCD pura con tampón crítico 10 mM que contenía etanol al 50 %, se combinó y se almacenó a -20 °C.

Determinación de la concentración de proteína

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

Ensayo de actividad enzimática de la GCD

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

Análisis bioquímicos:

Análisis de proteólisis en gel y espectrometría de masas

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

Se resolvieron los péptidos tripticos mediante cromatografía de fase inversa sobre capilares de sílice fusionados de 0,1 x 300 mm (J&W, DI de 100 micrómetros) rellenos en el laboratorio con R2 porosa (Persepective). Los péptidos se eluyeron usando un gradiente lineal de 80 min de acetonitrilo del 5 al 95 % con ácido acético al 0,1 % en agua a

un caudal de aproximadamente 1 μ l/min. Se electropulverizó el líquido de la columna en un espectrómetro de masas de trampa de iones (LCQ, Finnegan, San Jose, CA). La espectrometría de masas se realizó en el modo de ión positivo usando repetidas veces la exploración de EM completa seguida de la disociación inducida por colisión (CID) del ión más dominante seleccionado de la primera exploración de EM. Los datos de espectrometría de masas se compararon con la proteólisis simulada y la CID de las proteínas en la base de datos NR-NCBI usando el programa informático Sequest [J. Eng y J. Yates, Universidad de Washington y Finnegan, San José].

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

Captación de GCD de macrófagos peritoneales

Se sabe que la dirección y la captación de GCD por macrófagos están mediadas por el receptor de manosa/N-acetilglucosamina, y que se puede determinar usando macrófagos peritoneales generados por tioglicolato obtenidos de ratones, según lo descrito por Stahl P. y Gordon S. [J. Cell Biol. (1982) 93(1):49-56]. En síntesis, se inyectaron intraperitonealmente 2,5 ml de medio bacto-tioglicolato al 2,4 % sin dextrosa (Nº de cat. de Difco 0363-17-2) a ratones (hembra, cepa C57-B6). Tras 4-5 días, se sacrificaron los ratones tratados por dislocación cervical y se aclaró la cavidad peritoneal con solución salina tamponada con fosfato. Se sedimentaron las células por centrifugación (1.000 x g 10 min) y se volvieron a suspender en DMEM (Beit Haemek, Israel) que contenía suero bovino fetal al 10 %. Entonces, se sembraron las células a 1-2 x 10⁵ células/pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C. Tras 90 minutos, se lavaron tres veces las células no adherentes usando PBS y se incubaron los macrófagos adherentes durante 90 min a 37 °C en medio de cultivo que contenía cantidades especificadas de rHGCD que variaban de 0 a 40 microgramos en 200 microlitros de volumen final, en ausencia y presencia de manano de levadura (2-10,5 mg/ml). Tras la incubación, se eliminó el medio que contenía rHGCD en exceso y se lavaron tres veces las células con PBS y luego se lisaron con tampón de lisis (Tris 10 mM a pH = 7,3, MgCl₂ 1 mM, NP-40 al 0,5 % e inhibidores de proteasas). La actividad de rHGCD recogida por las células se determinó sometiendo los lisados celulares a ensayo de glucosidasa *in vitro* como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN

El presente ejemplo describe la construcción de un plásmido de expresión a modo de ejemplo usado con respecto a los ejemplos ofrecidos más adelante, con más detalle.

Se amplificó el ADNc que codifica hGCD (número de clon de ATTC 65696) usando el cebador directo: 5' CAGAATTCGCCCGCCCTGCA 3' (también denotado por la SEC ID Nº: 1) e inverso: 5' CTCAGATCTTGCGATGCCACA 3' (también denotado por la SEC ID Nº: 2).

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

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

Se secuenció el plásmido resultante para garantizar la correcta fusión en marco de las señales usando los siguientes cebadores de secuenciación:

Cebador del promotor ^{35S} de 5': 5' CTCAGAAGACCAGAGGGC 3' (también denotado por la SEC ID Nº: 5) y el terminador de 3': 5' CAAAGCGGCCATCGTGC 3' (también denotado por la SEC ID Nº: 6). La secuencia codificante de hGCD clonada verificada se denota por la SEC ID Nº: 7.

EJEMPLO 2

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE ZANAHORIA Y SELECCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS QUE EXPRESAN RHGCD

El presente ejemplo describe un método a modo de ejemplo para la transformación de células de zanahoria de acuerdo con la presente invención como el usado en los ejemplos que se presentan más adelante.

La transformación de células de zanahoria se realizó mediante la transformación con agrobacterias como se ha descrito previamente por [Wurtele y Bulka (1989), *ibid.*]. Se sembraron células de zanahoria genéticamente modificadas sobre medio agar Murashige y Skoog (MS) con antibióticos para la selección de transformantes. Como se muestra en la Fig. 2, se analizó la expresión de GCD de los extractos preparados a partir de los callos que se produjeron mediante un análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-hGCD, y se compararon con Cerezyme convencional (control positivo) y los extractos de células no transformadas (control negativo). De los diversos callos analizados, se seleccionó un callo (número 22) para aumentar a escala el crecimiento y la purificación de proteínas.

10 La transferencia Western se realizó del siguiente modo.

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

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

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

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

Tras la transferencia, se saturaron los sitios de unión libres sobre la nitrocelulosa a 4 °C durante una noche con tampón de bloqueo que contenía leche en polvo al 1 % (Dair y America) y Tween 20 al 0,1 % (cat de Sigma P1379) diluido con tampón fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435). Se incubaron las tiras de transferencia con un anticuerpo (dilución, 1:6.500 en tampón fosfato que contenía leche en polvo al 1 % y Tween 20 al 0,1 % como antes, pH 7,5) a 37 °C durante 1 hora.

Tras la incubación con el anticuerpo, se lavó tres veces la transferencia durante 10 minutos en cada caso con PBS (tampón fosfato de sodio tamponado con fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435)). A continuación, se incubaron las tiras de transferencia a temperatura ambiente durante 1 h con un anticuerpo secundario adecuado (cabra anti-conejo (molécula completa) HRP (cat de Sigma N° A-4914)), dilución 1:3000 en tampón que contenía leche en polvo al 1 % (Dair y America) y Tween 20 al 0,1 % (cat de Sigma P1379) diluido con tampón fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435)). Después de haberse lavado varias veces con PBS, se tiñeron las tiras de transferencia con reactivos reveladores ECL (Amersham RPN 2209).

Tras sumergir las transferencias en los reactivos ECL, se expusieron las transferencias a película de rayos X FUJI Super RX 18 x 24 y se revelaron con revelador y fijador FUJI-ANATOMIX (N° de cat de FUJI-X fix FIXRTU 1 out of 2). Tras este tratamiento, se hicieron visibles las bandas que mostraron las proteínas que se unieron por el anticuerpo.

Aumento a escala del crecimiento de cultivos en biorreactores

Los cultivos en suspensión del callo 22 se obtuvieron subcultivando el callo transformado en un medio líquido. Se cultivaron las células en matraces Erlenmeyer con agitación hasta que el volumen total fue suficiente para inocular el biorreactor (como se describe en el apartado de "Procedimientos experimentales"). Las células de zanahoria

transgénicas genéticamente modificadas se pueden cultivar durante meses, pudiéndose obtener la cosecha de células en ciclos de 5 a 7 días (datos no mostrados). Al séptimo día de cultivo, cuando la cantidad de producción de rh-GCD en célula de zanahoria está en el pico, las células se recogieron pasando el cultivo a través de redes de malla 100. Cabe señalar que las células se pueden recoger mediante medios conocidos en la técnica tales como filtración o centrifugación. La torta de concentrado de células, que proporciona el material para la purificación de h-GCD hasta la homogeneidad, se puede almacenar a la temperatura de congelación.

EJEMPLO 3

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA HGCD ACTIVA RECOMBINANTE DE CÉLULAS DE ZANAHORIA TRANSFORMADAS

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

Para separar el medio de la GCD insoluble, se descongeló la torta de células congeladas que contenía aproximadamente 100 g de células en peso húmedo, tras lo que se centrifugó a 17.000 x g durante 20 min a 4 °C. Se lavaron los materiales insolubles y las células intactas por resuspensión en 100 ml de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM) y se precipitaron por centrifugación a 17.000 g durante 20 min a 4 °C. Se extrajo la rGCD y se solubilizó mediante homogeneización del sedimento en 200 ml de tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, EDTA 20 mM, PMSF 1 mM, ácido ascórbico 20 mM, 3,8 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), DTT 1 mM, Triton-x-100 al 1 % (Sigma)). Se agitó el homogeneizado durante 30 min a temperatura ambiente y se aclaró por centrifugación a 17.000 x g durante 20 min a 4 °C. Se desechó el sedimento y se ajustó el pH del sobrenadante a pH 5,5 mediante la adición de ácido cítrico concentrado. Se aclaró la turbidez generada tras ajustar el pH por centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente.

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

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

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

Se combinaron las fracciones del pico de absorbente en la etapa de elución y se aplicaron sobre una tercera columna, para una tercera etapa de purificación. La tercera etapa de purificación se realizó sobre una columna XK (1,6 x 20 cm) empaquetada con 8 ml de resina de interacción hidrófoba (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, Tosoh Corp.). Se equilibró la resina en tampón citrato 10 mM a pH 6,0 que contenía etanol al 5 %. Se cargó la combinación de elución de GCD de la columna previa a 6 ml/min, tras lo que se lavó con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia UV alcanzó la línea basal. Se eluyó la GCD pura con tampón cítrico 10 mM que contenía etanol al 50 %, se recogió y se almacenó a -20 °C.

La Fig. 4A representa una ejecución convencional de esta etapa de purificación. Las fracciones recogidas durante la ejecución se monitorizaron mediante el ensayo de la actividad enzimática (Fig. 4B, y la Fig. 4C muestra la tinción con azul de Coomassie de fracciones de elución ensayadas en cuanto a la actividad.

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

5 *Análisis bioquímicos*

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

Captación y actividad de hGCD recombinante en macrófagos peritoneales

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

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

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

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

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

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

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

45 **EJEMPLO 4**

ENSAYOS DE TOXICOLOGÍA

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

Los ratones recibieron las siguientes inyecciones: una dosis inicial de 1,8 mg/kg (dosis clínica) seguida de dosis de 9 y 18 mg/kg. Los grupos de ensayo incluían seis ratones (ICR CD-1; 3 machos y 3 hembras) para recibir rGCD (en un vehículo líquido que presentaba tampón citrato 25 mM, NaCl 150 mM, Tween 80 al 0,01 %, etanol al 5 %) de acuerdo con la presente invención, y otros seis ratones para ser tratados con el vehículo solo como grupo de control. Entonces, se observaron los ratones durante 14 días y se sacrificaron. Ninguno de los ratones murió antes de la eutanasia programada. Ninguno de los ratones mostró ningún efecto significativo del tratamiento. No se encontraron hallazgos ni/o cambios patológicos macroscópicos en el peso corporal de ninguno de los ratones.

EJEMPLO 5**ANÁLISIS DE GLUCOSILACIÓN**

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

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

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

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

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

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

Materiales y métodos

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

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

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

Descripción experimental**Muestra**

Los viales de muestra recibieron los siguientes números de muestra únicos tras su recepción (Tabla 1):

60

Tabla 1

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

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

Química de proteínas

5 **Diálisis de muestras intactas**

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

10

Digestión con tripsina de las muestras intactas para la selección de oligosacáridos

Se suspendió la muestra liofilizada sometida a diálisis en tampón bicarbonato de amonio 50 mM ajustado a pH 8,4 con amoníaco acuoso al 10 %, y se digirió con tripsina tratada con TPCK durante 4 horas a 37 °C de acuerdo con los SOP B001 y B003. La reacción se terminó disponiéndola en un bloque térmico a 95 °C durante 2 minutos seguido de liofilización.

15

Química de hidratos de carbono

20 **Digestión de la péptido N-glucosidasa A**

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

25

Eliminación reductora

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

30

Desalación del material reductoramente eliminado

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

35

Permetilación de los hidratos de carbono liberados

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

40

Análisis de enlaces del hidrato de carbono ligado a N

45

Derivatización

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

55

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

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

60

Cromatografía de gases

65 Columna: DB5
 Inyección: Sobre la columna

Temperatura del inyector: 40 °C
 Programa: 1 minuto a 40 °C, luego 70 °C/minuto hasta 100 °C, mantenimiento a 100 °C durante 1 minuto, luego 8 °C/minuto hasta 290 °C, finalmente mantenimiento a 290 °C durante 5 minutos.

5 Gas portador: Helio

Espectrometría de masas

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

Análisis de azúcares de glucocerebrosidasa intacta

15

Derivatización

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

Espectrometría de masas/cromatografía de gases

30

(EM/CG)

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

Cromatografía de gases

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

Espectrometría de masas

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

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

55

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

60

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

Se llevaron a cabo análisis de espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos de iones positivos en el espectrómetro de masas M-Scan's VG AutoSpecE funcionando a Vac = 8 kV para un intervalo de masas de 4.500 a sensibilidad completa con una resolución de aproximadamente 2.500. Se usó una pistola de ión cesio para generar

65

espectros que funcionaban a 30 kV. Los espectros se registraron en un sistema de datos VAX 3100 M76 usando el programa informático Opus.

5 Se volvieron a disolver los glucanos permitilados secados en metanol y se cargaron sobre una diana previamente manchada con 2-4 μ l de tioglicerol como matriz antes de la inserción en la fuente.

Resultados y discusión

Análisis de azúcares con TMS de glucocerebrosidasa

10

Selección de oligosacáridos ligados a N

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

Análisis de N-glucanos de glucocerebrosidasa

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

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

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

40

Señales observadas (m/z)	Posible asignación
Baja masa	
219	Hex ⁺
228	HexNAc ⁺ (- metanol)
260	HexNAc ⁺
Alta masa	
1032,4	Pent.Hex ₃ .HexNAc ⁺
1171,5	Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1299,6	Eliminación de fucosa de m/z 1505,8
1331,6	Pent.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1345,6	desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1505,7	Pent.desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1579,8	Hex ₅ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1709,9	Pent.desoxiHex.Hex ₄ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1750,9	Pent.desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₃ OMe + Na ⁺
1783,9	Hex ₆ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1989,0	Hex ₇ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1997,0	Pent.desoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₄ OMe + Na ⁺
2027,0	No asignado
2099,0	No asignado
2130,0	Pent.desoxiHex ₂ .Hex ₄ .HexNAC ₃ OMe + Na ⁺
2193,1	Hex ₈ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺

2375,2	Pent.desoxiHex ₂ .Hex ₄ .HexNAc ₄ OMe + Na ⁺
2753,4	Pent.desoxiHex ₃ .Hex ₅ .HexNAc ₄ OMe + Na ⁺

Todas las masas de la columna uno son monoisotópicas, a menos que se establezca lo contrario. Los números másicos pueden no relacionarse directamente con los datos brutos, ya que el programa informático frecuentemente asigna números másicos a picos de isótopos de ¹³C, particularmente para masas superiores a 1.700 Da.

5

Análisis de enlaces de N-glicanos de glucocerebrosidasa

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

10

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

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

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

Selección de oligosacáridos ligados a O en 4.3

20

Se llevó a cabo la eliminación reductora en la fracción de 2-propanol al 60 % (posible fracción de glucopéptidos ligados a O) de la purificación de Sep-Pak de glucocerebrosidasa tras las digestiones con tripsina y PNGasa A. Una vez finalizada la reacción, se desaló la muestra y, tras eliminar el borato, se permetiló. Se obtuvieron espectros de masas de FAB usando una parte del oligosacárido derivatizado en un intervalo de baja masa para los iones de fragmentos y se obtuvieron espectros de masas de ER-MALDI-TOF usando una parte de los oligosacáridos derivatizados en un intervalo de alta masa para iones moleculares. No se observaron señales relativas a la presencia de glicanos ligados a O (datos no mostrados).

25

Análisis de enlaces de O-glicanos de glucocerebrosidasa

30

Se llevó a cabo un análisis de enlaces en los productos de la eliminación reductora tras la permetilación. No se observaron señales relativas a la presencia de glicanos ligados a O típicos (datos no mostrados).

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

35

40

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

45

Las Figuras 8A-8D muestran todas las posibles estructuras para los N-glicanos detectados en la proteína rGCD de acuerdo con la presente invención.

50

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

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

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

20 Con respecto a la selección de oligosacáridos ligados a O, no se observaron señales relativas a los glucanos ligados a O típicos. La GCD se conoce en la técnica por no tener oligosacáridos ligados a O, de forma que estos resultados coinciden con la glucosilación conocida de la GCD de otros sistemas celulares, incluyendo la GCD nativa y GCD recombinante producida en sistemas de cultivo de mamífero. Sin embargo, en la composición de monosacáridos, se detectaron señales relativas a la arabinosa.

25 Un punto importante es que el análisis de la composición de N-glucanos de la proteína hGCD demostró que la mayoría de los N-glucanos terminan con restos de manosa. Esto coincide con el requisito de N-glucanos que terminen en manosa que ayuden en la captación de hGCD terapéutica por parte del macrófago receptor de manosa. Sin embargo, ni la GCD nativa ni la GCD recombinante producidas en células de mamífero tiene un alto contenido de manosa. Por lo tanto, la presente invención supera un inconveniente significativo de las proteínas hGCD producidas a nivel comercial, que es que estas proteínas están *modificadas* para terminar con azúcares de manosa, a diferencia de la proteína producida como se ha descrito anteriormente.

30

Listado de secuencias

SEC ID Nº: 1

35 Secuencia de aminoácidos del péptido señal dirigido al RE:
MKTNLFLFLIFSLLLLSLSSAEF

SEC ID Nº: 2

40 Secuencia de aminoácidos de la señal de direccionamiento vacuolar de la quitinasa A del tabaco:
DLLVDTM

SEC ID Nº: 3

45 Secuencia de ácido nucleico del cebador directo:
Cagaattgcccgcccctgca

SEC ID Nº: 4

50 Secuencia de ácido nucleico del cebador inverso:
ctcagatctggcgatgccaca

SEC ID Nº: 5

55 Secuencia de ácido nucleico del cebador directo del promotor 358:
Ctcagaagaccagaggct

SEC ID Nº: 6

60 Secuencia de ácido nucleico del cebador inverso del terminador:
Caaagcggccatcgtgc

SEC ID Nº: 7

65 Secuencia de ácido nucleico del ADNc de la GCD humana usado para las construcciones de la invención

gccccccc ctgcatccct aaaagcttcg gctacagctc ggtggtgtgt

gtctgcaatg ccacatactg tgactccttt gacccccga cctttcctgc ccttggtagc ttcagccgct
atgagagtac acgcagtggg cgacggatgg agctgagtat ggggcccatac caggctaatac acacgggcac
aggcctgcta ctgaccctgc agccagaaca gaagttccag aaagtgaagg gatttggagg ggccatgaca
gatgctgctg ctctcaacat ccttgccctg tccccctcg cccaaaattt gctactaaa tctacttct
ctgaagaagg aatcggatat aacatcatcc ggttaccat gccagctgt gacttcicca tccgcaccta
cacctatgca gacaccctg atgattcca gttgcacaac ttcagcctcc cagaggaaga taccaagctc
aagatacccc tgattaccg agccctgcag ttggcccagc gtcccgttc actccttgc agccctgga
catcaccac ttggtcaag accaatggag cggatgaatg gaaggggtca ctaagggac agccccgaga
catctaccac cagacctggg ccagatactt tgtgaagtc ctggatgct atgctgagca caagttacg
ttctgggcag tgacagctga aatgagcct tctgctgggc tgttgagtgg atacccttc cagtgcctgg
gcttaccccc tgaacatcag cgagacttca ttgcccgtga cctaggctc accctcgcca acagtactca
ccacaatgct cgcctactca tgctggatga ccaacgctt ctgctgcccc actgggcaaa ggtggtactg
acagaccag aagcagctaa atatgtcat ggcattgctg tacattgta cctggacttt ctggctccag
ccaaagccac cctaggggag acacaccgcc tgttcccaa caccatgctc tttgctcag aggcctgtgt
gggtccaag ttctgggagc agagtgctg gctaggctcc tgggatcgag ggatgcagta cagccacagc
atcatcacga acctctgta ccatgtgctc ggtggaccg actggaacct tgcctgaac cccgaaggag
gacccaattg ggtgcgtaac tttgctgaca gtccatcat ttagacatc accaaggaca cgttttaca
acagcccatg ttctaccacc ttggccactt cagcaagtc attcctgagg gctcccagag agtggggctg
gttggcagtc agaagaacga cctggacgca gttgactga tgcatcccga tggctctgct gttgtggctg

tgctaaaccg ctctctaag gatgtgctc ttaccatcaa ggtcctgct gttggcttc tggagacaat
ctcactgac tactcattc acacctact gttgcatgc cag

SEC ID Nº: 8

Secuencia de aminoácidos de la glucocerebrosidasa

5

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

SEC ID Nº: 9

Secuencia de ácido nucleico del promotor ³⁵S

Ttttcacaaagggttaataatcgggaaacctcctcggattccattgccagctatctgtcacttcacg
aaaggacagtagaaaaggaagggtggctcctacaaatgccatcattgataaaaggaaaggctatcgttca
agatgcctctaccgacagtggtcccaaagatggacccccaccacgaggaacatcgtggaaaaagaaga
cgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggtgattgatgtgatctccactgacgtaagggatgacgcacaat
cccactatccttcgcaagaccttctctatataaggaagttcatttcatttgagaggac

5

SEC ID Nº: 10

Secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal al RE
atgaagactaatcttttctcttctcacttctc ctatcattatcctcgccgaattc

10

SEC ID Nº: 11

Secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de direccionamiento vacuolar
gatcttttagtcgatactatg

15

SEC ID Nº: 12

Secuencia de ácido nucleico del terminador

taatttcagatctgttttggattcccttgcaatgcagggcctagggtatgaAtaaagttaatgt
gtgaatgtgigaatgtgtgattgtgacctgaagggatcacgactataatcgtttataataaacaagactttg
tccccaaaacccccccccngcaga

20

SEC ID Nº: 13

Secuencia de ácido nucleico del casete de expresión de la invención

ttttcacaagggttaatatcgggaaacctcctcggattccattgccagctatctgtcacttcatcg
 aaaggacagtagaaaaggaaggtggctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgttca
 agatgcctctaccgacagtggtcccaaagatggacccccaccacgaggaacatcgtggaaaaagaaga
 cgtccaaccacgtcttcaaagcaagtggtgatgtgatctcactgacgtaagggatgacgcacaat
 cccactatccttcgcaagacccttctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacaggcttcttgag
 afccttcaacaattaccaacaacaacaacaacaacattacaattactattacaattacagtcga
 gggatccaaggagatataacaatgaagactaatcttttctcttctcatctttcacttctcctatcattatcc

tcggccgaattcgcggccctgcatccctaaaagcttcggctacagctcgggtggtgtgtctgcaatgcc
 acatactgtgactccttgacccccgaccttctgccttggtagcttcagccgctatgagagtacacgca
 gtggcgacggatggagctgagatggggccatccaggctaatacacagggcacaggcctgctactgac
 cctgcagccagaacagaagttccagaaagtgaagggttggagggccatgacagatgctgctgctctc
 aacatccttgccctgtcaccctgcccaaaatttgcacttaaatcgtacttctctgaagaaggaatcgga
 tataacatcatccgggtaccatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacaccct
 gatgattccagttgcacaactcagcctcccagaggaagataccaagctcaagataccctgattcaccg
 agcctgcagttggcccagcgtcccttctactccttgccagccctggacatcaccacttggctcaagac
 caatggagcggatgaatgggaaggggtcactcaaggagacagccggagacatctaccaccagacctgggc
 cagatactttgtgaagttcctggatgcctatgctgagcacaagttacagttctgggcagtgacagctgaaaa
 tgagccttctgctgggtgttgagtgatacccttccagtgctgggttaccctgaacatcagcgagac
 ttattgcccgtgacctaggtcctaccctgccaacagtaactcaccacaatgtccgcctactcatgctggatg
 accaacgcttgcctgctgcccactgggcaaagggtgactgacagaccagaagcagctaaatatgttcat
 ggcattgctgtacattggtacctgacttctggctccagccaaagccaccctaggggagacacaccgct
 gtccccaacaccatgctccttgccctcagaggcctgtgtggctccaagttctgggagcagagtgtgaggta
 ggctcctgggatcagggatgcagtcagccacagcatcatcacgaacctcctgtaccatgtggctggctg
 gaccgactggaacctgcccgaaccccgaaggaggaccaattgggtgcgtaacttgtcgacagtccc
 tcattgtagacataccaaggacacgtttacaacagccccatgttctaccaccttggccacttcagcaagt
 tcattctgagggctcccagagagtggggctggttggcagtcagaagaacgacctggacgagtgactg
 atgcatcccgatggctctgctgtgtgtgctgctaaaccgctcctcctaaggatgtgctcttaccatcaagg
 atcctgctgtggcttctggagacaatctcactggctactccattcacacctaccttggcatgccaag
 atcttttagtcgatactatgtaatttcatgatctgtttgttattcccttgcaatgcaggcctagggtatga
 Ataaagttaatgtgtgaatgtgtgaatgtgtgattgtgacctgaagggatcacgactataatcgtttataata
 aacaaagacttgtccaaaaacccccccccnngcaga

SEC ID N°: 14
 Secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante de la invención

5

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

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

Referencias

- 5 1. Ma, J. K. C., Drake, P. M. W. y Christou, P. (2003) *Nature reviews* 4, 794-805.
2. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V., Faye, L. (1998) *Plant Mol Biol* 38, 31-48.
3. Lee, R. E. (1982) *Prog Clin Biol Res* 95, 177-217.
4. Grabowski, G. (1993) *Adv Hum Genet.* 21, 377-441.
- 10 5. Grabowski, G. A. y Hopkin, R. J. (2003) "Annual Review of Genomics and Human Genetics" 4, 403-436.
6. Sorge, J. W., C. Westwood, B., Beutler, E. (1985) *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 82, 7289-7293.
7. Berg-Fussman, A., Grace, M., Ioannou, Y. y Grabowski, G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14861-14866.
8. Grace, M., Grabowski, G. A. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 168, 771-777.
9. Grace, M., Newman, K., Scheinker, V., Berg-Fussman, A. y Grabowski, G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2283-2291.
- 15 10. Barton, N. W., Brady, R. O., Dambrosia, J. M., Di Bisceglie, A. M., Doppelt, S. H., Hill, S. C., Mankin, H. J., Murray, G. J., Parker, R. I., Argoff, C. E., *et al.* (1991) *N Engl J Med.* 324, 1464-1470.
11. Grabowski, G. A., Barton, N. W., Pastores, G., Dambrosia, J. M., Banerjee, T. K., McKee, M. A., Parker, C., Schiffmann, R., Hill, S. C. y Brady, R. O. (1995) *Ann Intern Med* 122, 33-39.
- 20 12. Pastores, G. M., Sibille, A. R., Grabowski, G. A. (1993) *Blood* 82, 408-416.
13. Weinreb, N. J., Charrow, J., Andersson, H. C., Kaplan, P., Kolodny, E. H., Mistry, P., Pastores, G., Rosenbloom, B. E., Scott, C. R., Wappner, R. S., Zimran, A. (2002) *Am J Med.* 113, 112-119.
14. Bijsterbosch, M. K., Donker, W., van de Bilt, H., van Weely, S., van Berkel, T. J., Aerts, J. M. (1996) *Eur J Biochem* 237, 344-349
- 25 15. Friedman, B., Vaddi, K., Preston, C., Mahon, E., Cataldo, J. R. y McPherson, J. M. (1999) *Blood* 93, 2807-2816.
16. Furbish, F. S., Steer, C. J., Krett, N. L., Barranger, J. A. (1981) *Biochim Biophys Acta* 673, 425-434.
17. Doebber, T., Wu, M., Bugianesi, R., Ponpipom, M., Furbish, F., Barranger, J., Brady, R. y Shen, T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2193-2199.
- 30 18. Dwek, R. A., Butters, T. D., Piatt, F. M., Zitzmann, N. (2002) *Nature reviews* 1, 65-75.
19. Neuhaus, J. M., Rogers, J. C. (1998) *Plant Mol Biol* 38, 127-144.
20. Vitale, A y Galili, G. (2001) *Plant Physiol.* 125, 115-118.
21. Hellens, R., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., Mullineaux, P. M. (2000) *Plant Mol Biol* 42, 819-832.
22. Wurtele, E. S., Bulka, K. (1989) *Plant Sci* 61, 253-26.

23. den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P. J. (1995) *Methods Mol Biol.* 55, 63-72.
24. Laemmli, U. K. (1970) *Nature reviews* 227, 680-685.
25. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* 72, 248-254.
26. Stahl, P. G. S. (1982) *J Cell Biol* 93, 49-56.
- 5 27. Takasaki, S., Murray, G., Furbish, F., Brady, R., Barranger, J. y Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10112-10117.
28. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C, Fitchette-Laine, A. C, Gomord, V. y Faye, L. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38, 31-48.
29. Frigerio, L., Pastres, A., Prada, A. y Vitale, A. (2001) *Plant Cell* 13, 1109-1126.
- 10 30. Frigerio, L., de Virgilio, M., Prada, A., Faoro, F. y Vitale, A. (1998) *Plant Cell* 10, 1031-1042.
31. Hadlington J. L., D. J. (2000) *Curr Opin Plant Biol.* 3, 461-468.
32. Okamoto, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. y Minamikawa, T. (2003) *Plant Physiol.* 132, 1892-1900.
- 15 33. Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A. C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L. y Lerouge, P. (2003) "Glycobiology" 13, 427-434.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína glucocerebrosidasa (GCD) humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa ligada de manera contigua en su terminal C a un péptido señal de direccionamiento vacuolar que consiste en la SEC ID N°: 2, en donde dicha proteína glucocerebrosidasa humana está glucosilada y comprende al menos una manosa expuesta, en donde dicha proteína GCD humana comprende además al menos una fucosa que tiene un enlace alfa (1-3)-glucosídico y al menos una xilosa, y en donde la proteína GCD humana no está codificada por la SEC ID N°: 7.
- 10 2. La proteína de la reivindicación 1, en donde dicha proteína GCD humana está codificada por la SEC ID N°: 13.
3. La proteína de la reivindicación 1 o 2, que está aislada.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende la proteína glucocerebrosidasa humana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Una célula vegetal que expresa la proteína glucocerebrosidasa humana de la reivindicación 1 o 2.
6. La célula vegetal de la reivindicación 5, en donde dicha célula vegetal es una célula de zanahoria.
- 20 7. La célula vegetal de la reivindicación 5 o 6, en donde la estructura de glucano principal de dicha proteína glucocerebrosidasa de dicha célula vegetal comprende dicha manosa expuesta.
8. Una composición farmacéutica que comprende células vegetales de la reivindicación 5 o 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Una proteína glucocerebrosidasa humana que tiene actividad catalítica de la glucocerebrosidasa ligada de manera contigua en su terminal C a un péptido señal de direccionamiento vacuolar que consiste en la SEC ID N°: 2, en donde dicha proteína glucocerebrosidasa humana está glucosilada y comprende al menos una manosa expuesta, en donde dicha proteína GCD humana comprende además al menos una fucosa que tiene un enlace alfa (1-3)-glucosídico y al menos una xilosa, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.
- 30 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 o la proteína glucocerebrosidasa humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 formulada para la administración oral.
- 35 11. La célula vegetal de la reivindicación 6, en donde dicha célula vegetal es una célula de zanahoria cultivada en suspensión.

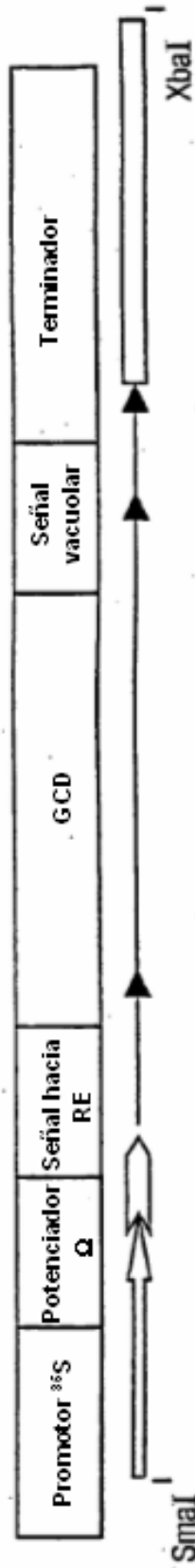


Fig. 1a

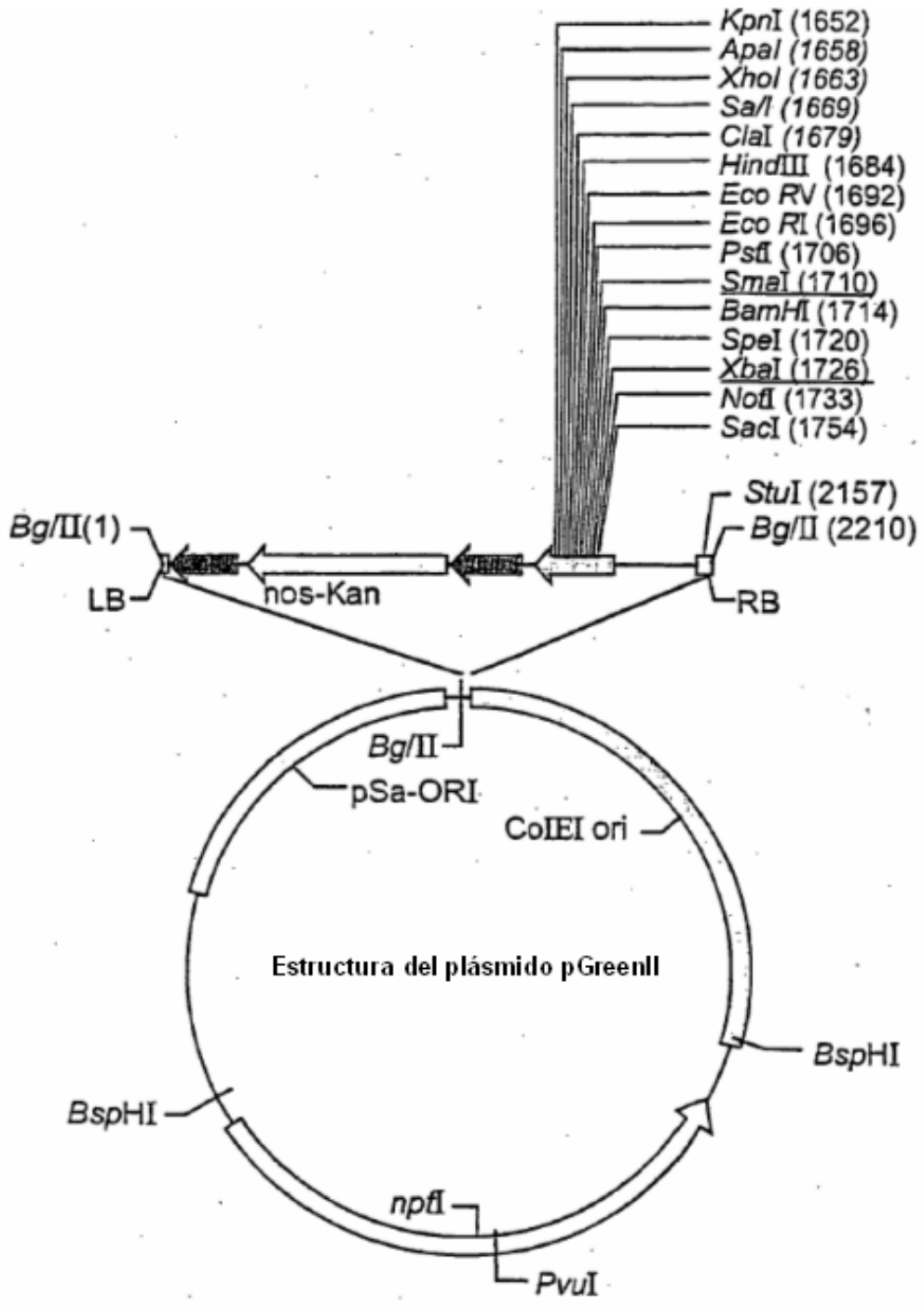


Fig. 1b

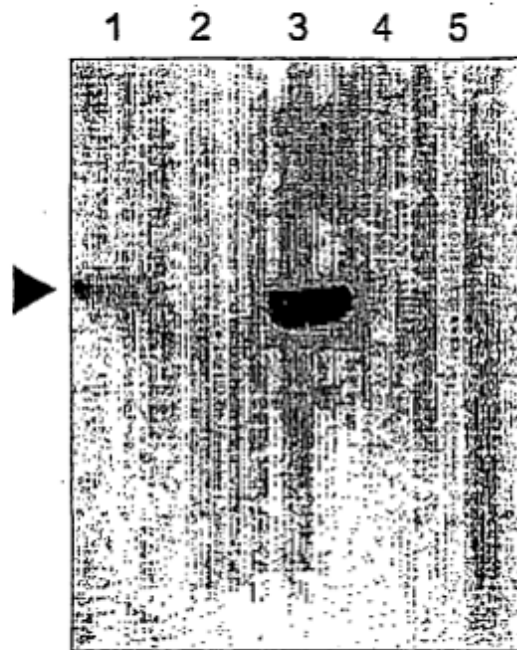


Fig. 2

Células transformadas expresan rGCD. Se homogenizó 1 gramo de tejido de callo y se procesaron 15 microgramos de extracto celular soluble en SDS-PAGE. La expresión de rGCD en los callos transformados seleccionados se ensayó mediante análisis de transferencia Western con anticuerpos específicos anti-hGCD. 1: Cerezyme convencional; 2: extracto de callo sin transformar; 3-5: diversos extractos de callos transformados seleccionados.

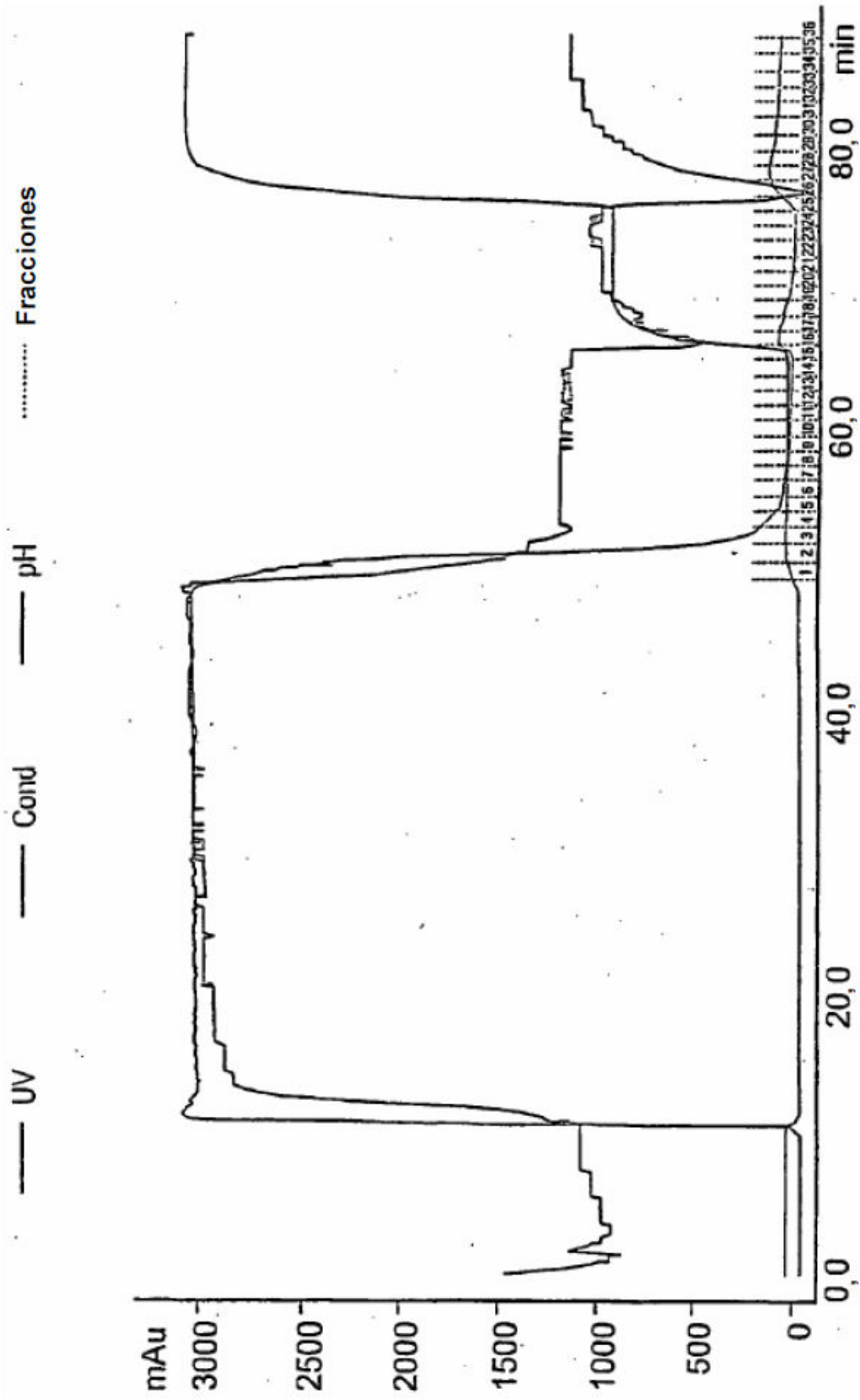
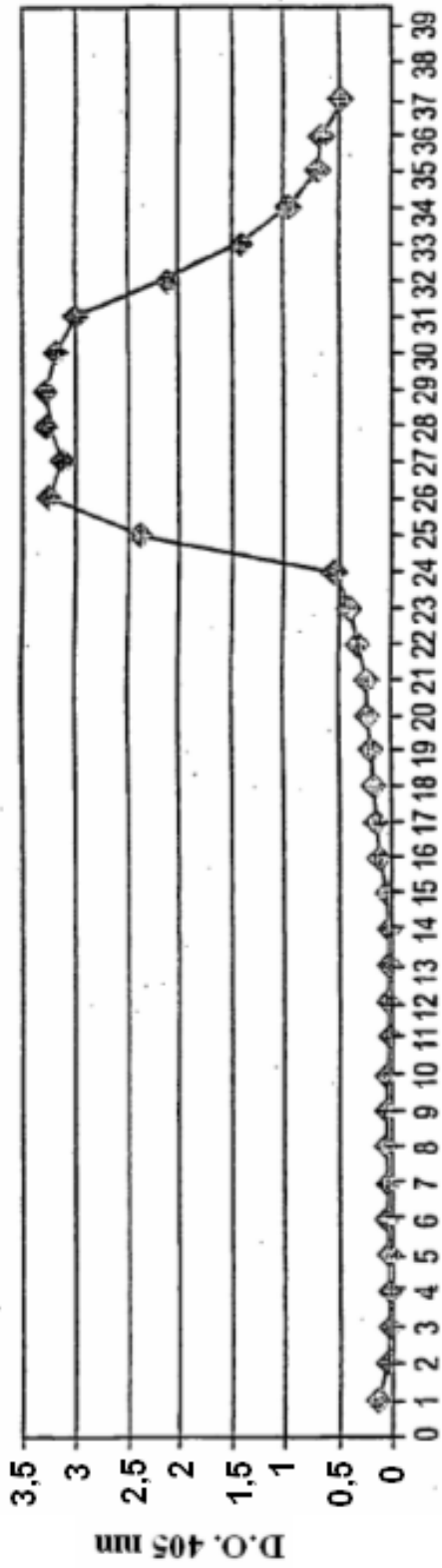


Fig. 3a



Fracción Fig. 3b

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

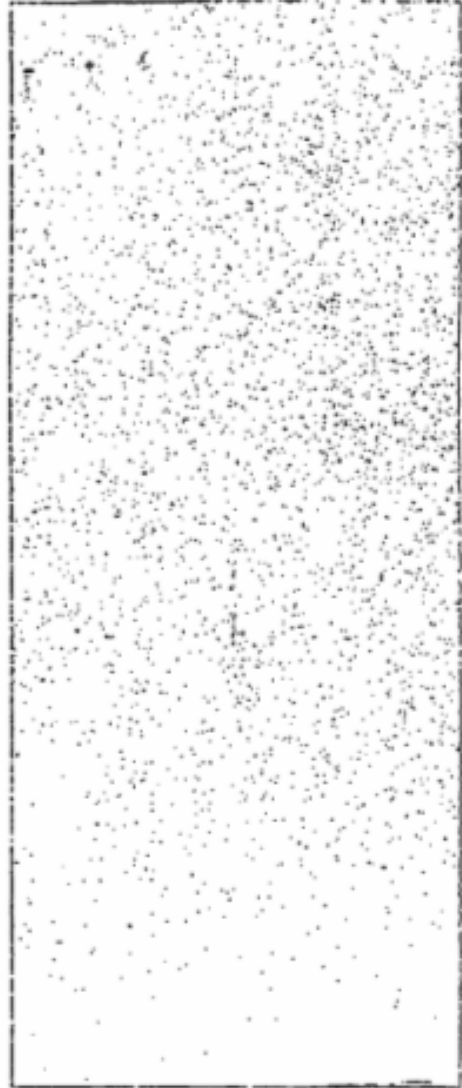


Fig. 3c

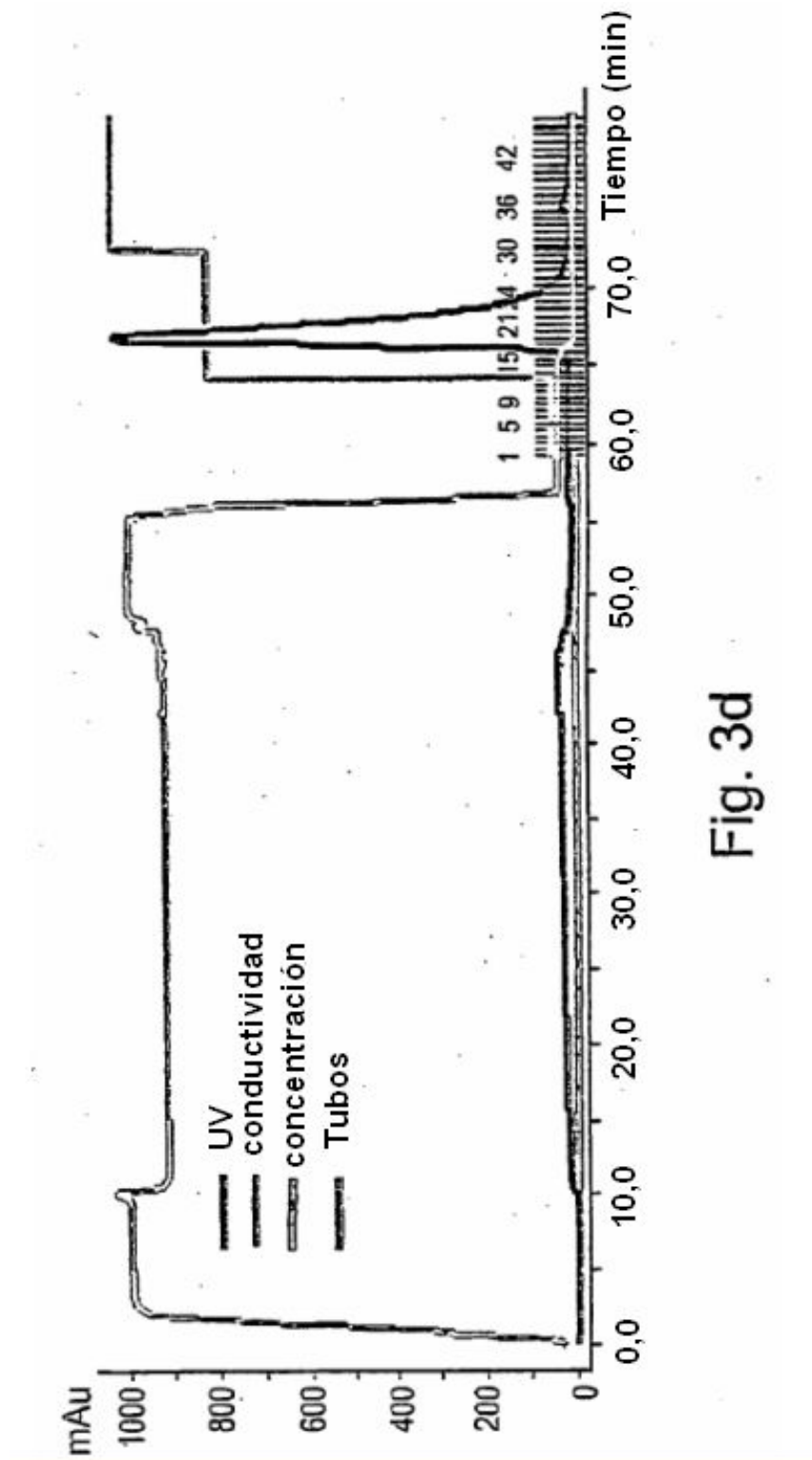


Fig. 3d

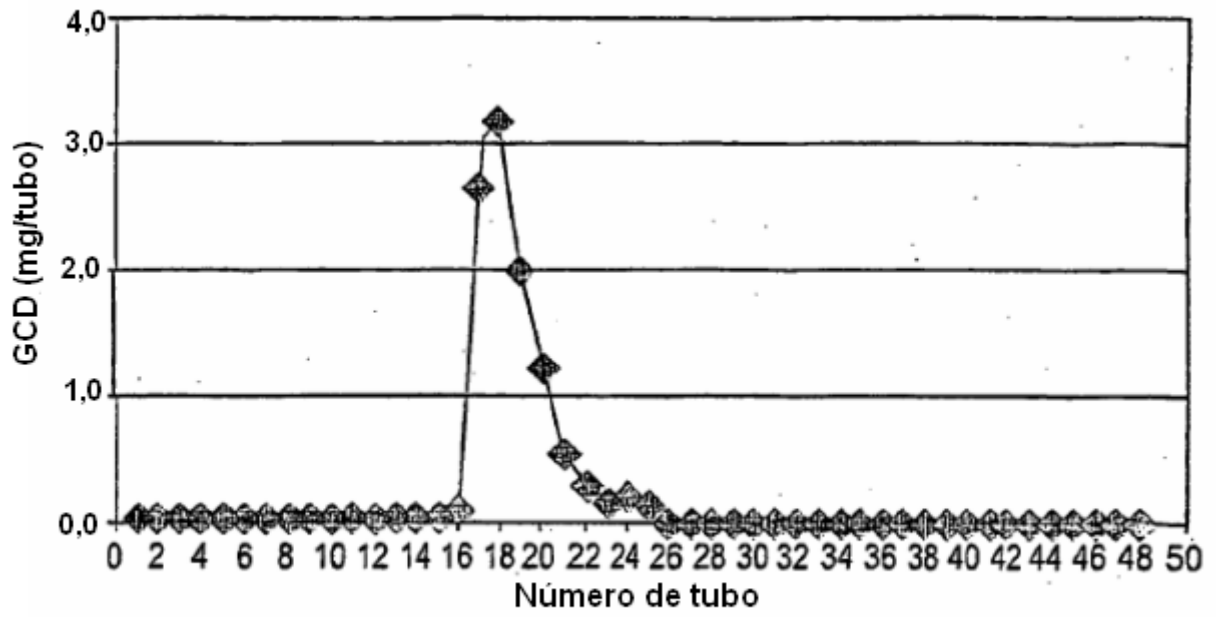


Fig. 3e

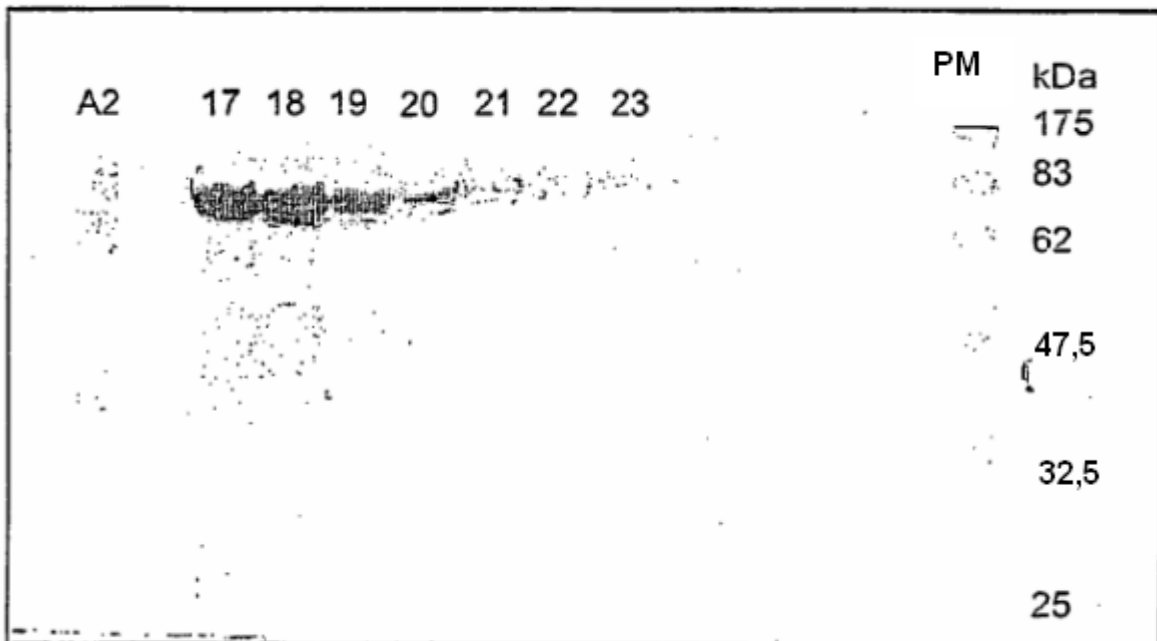


Fig. 3f

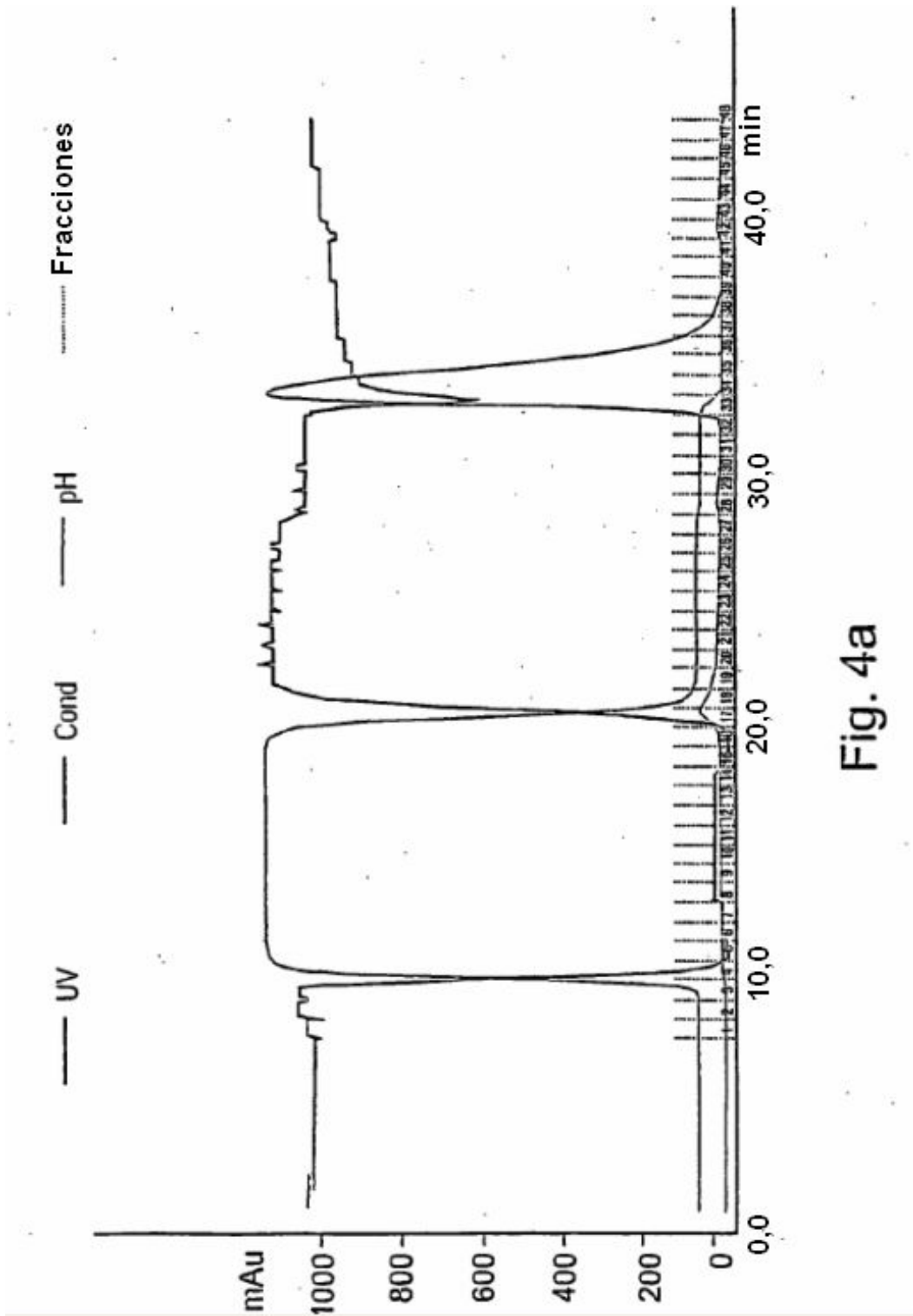
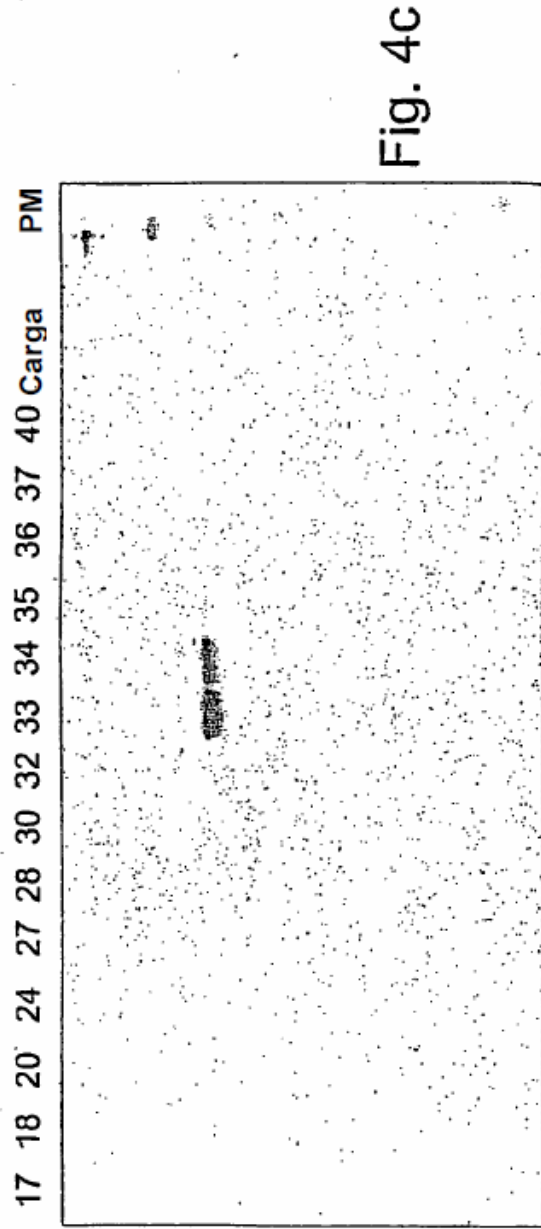
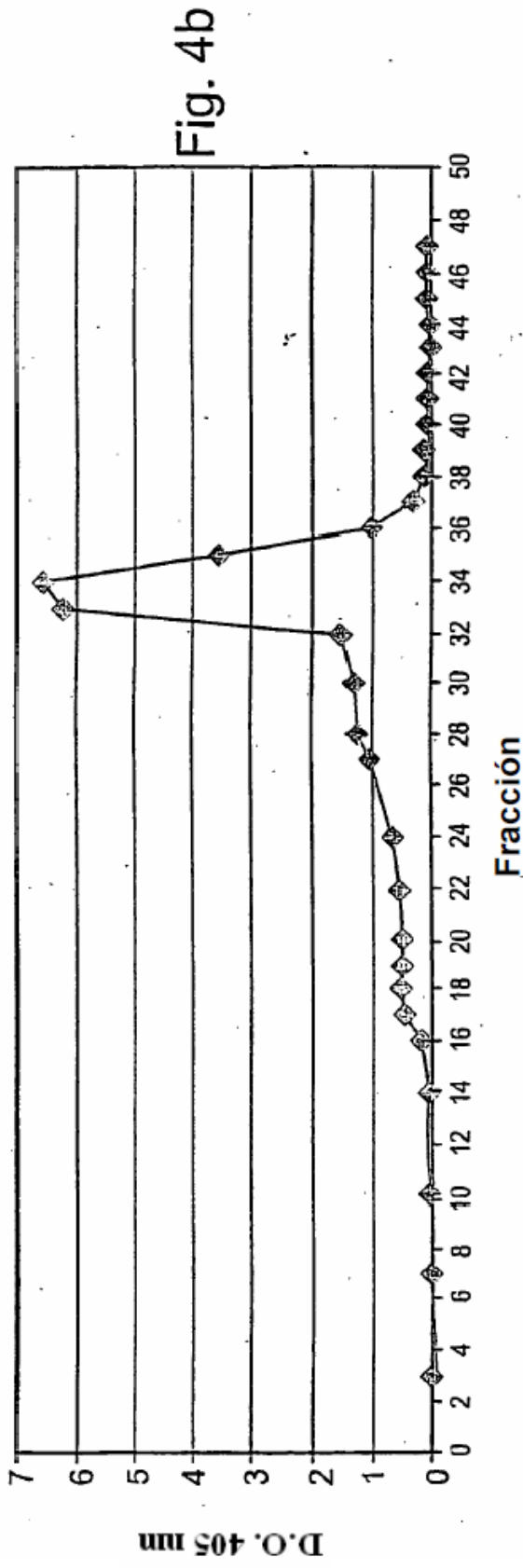


Fig. 4a



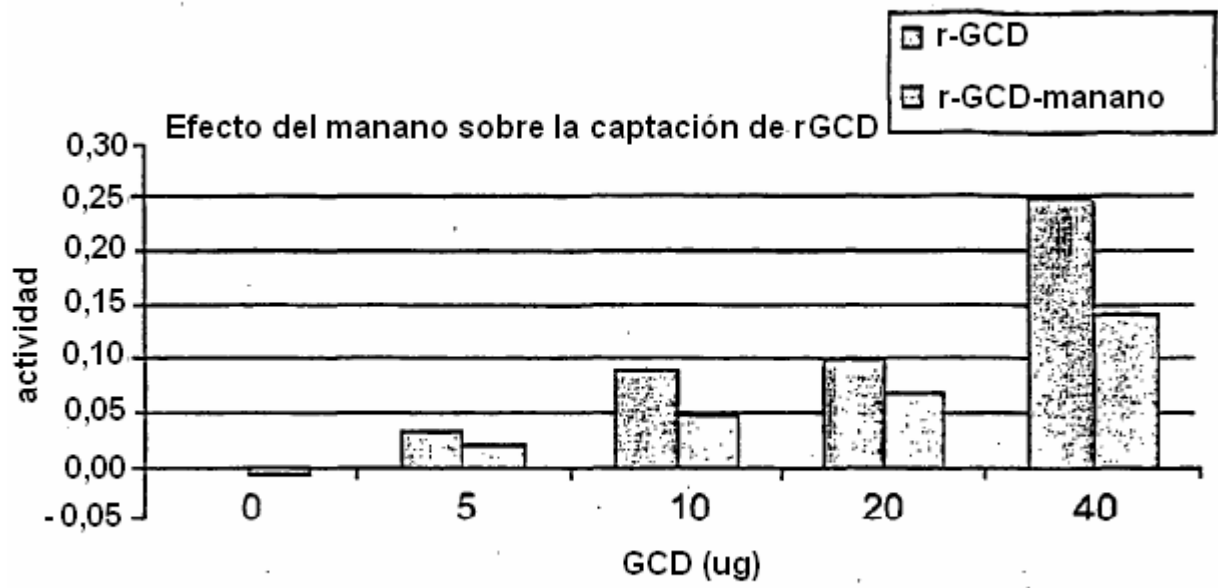


Fig. 5a

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

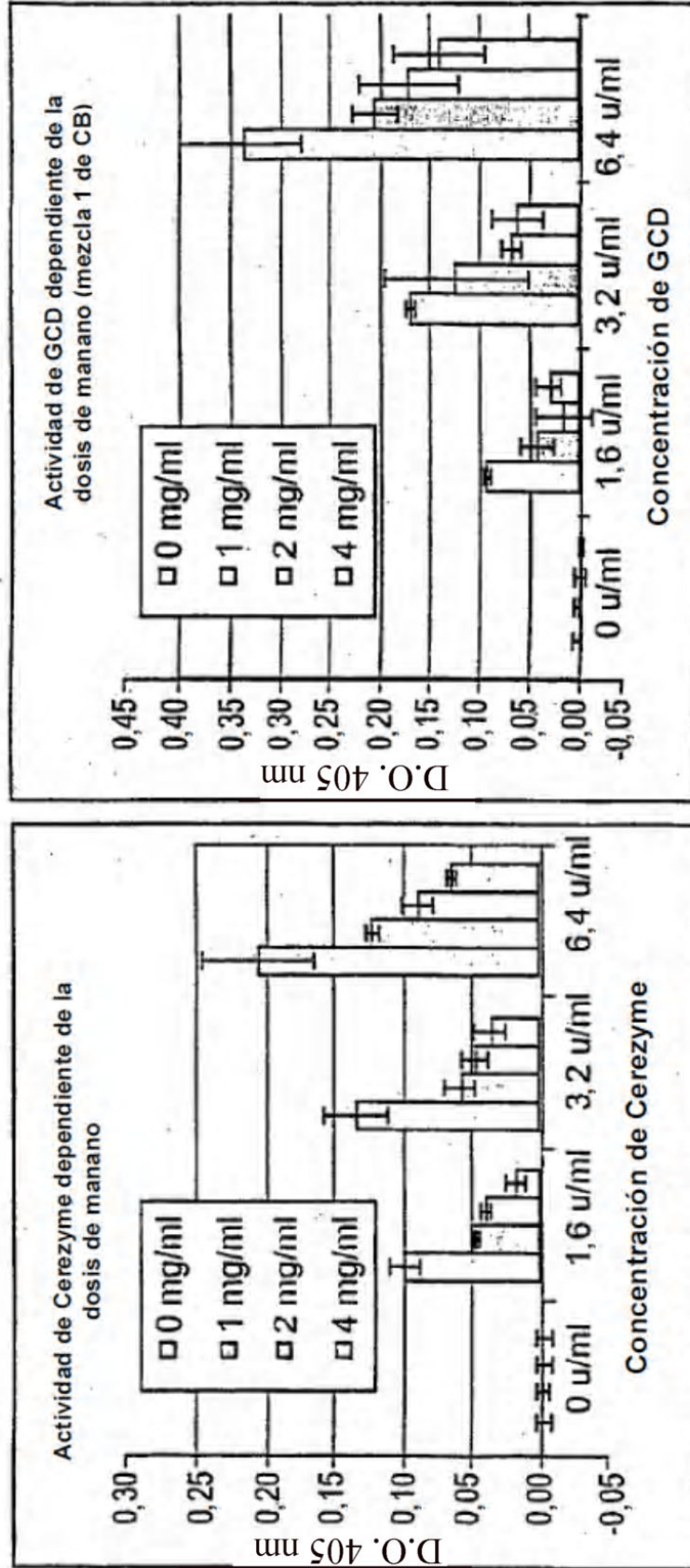


Fig. 5b

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

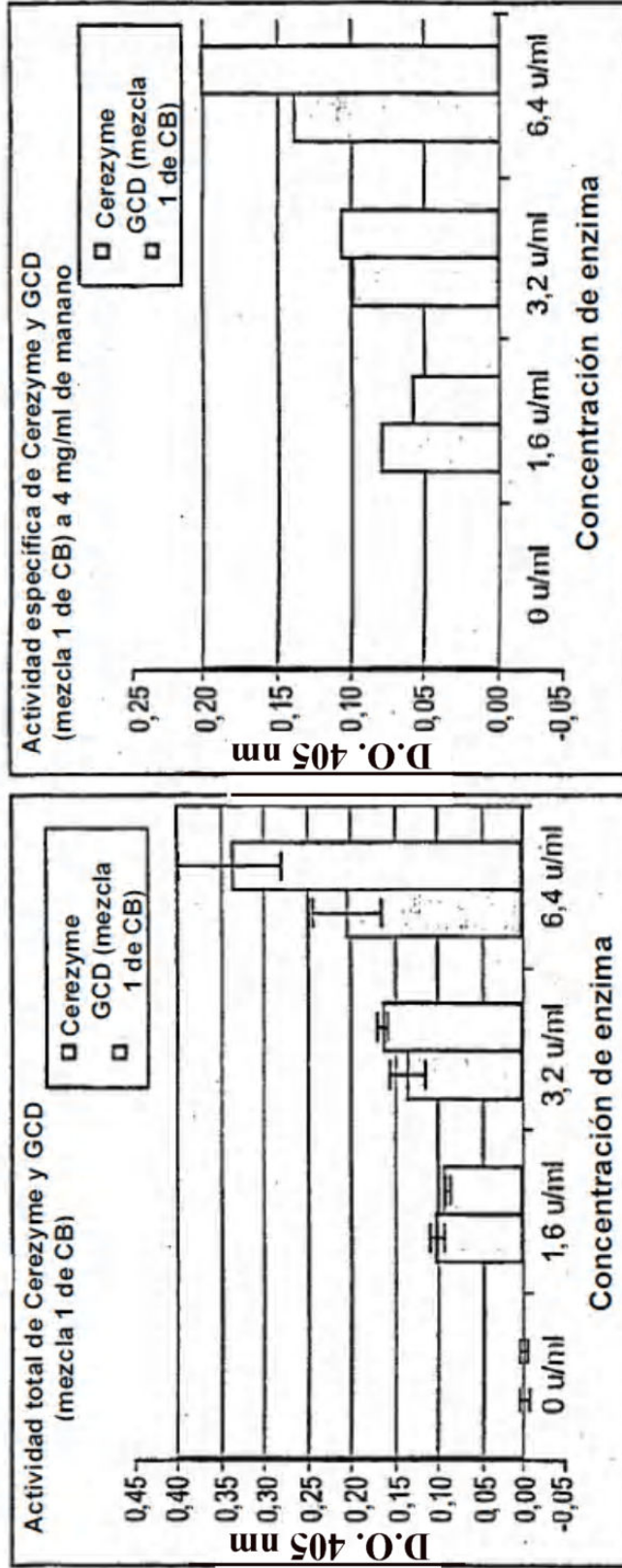


Fig. 5c

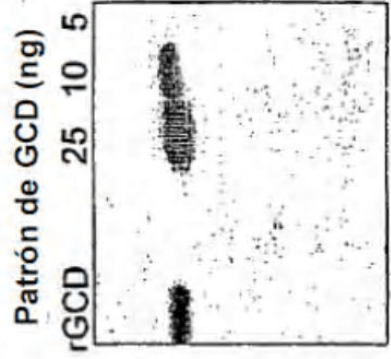
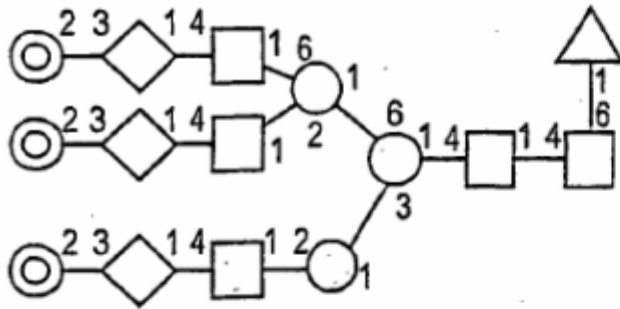
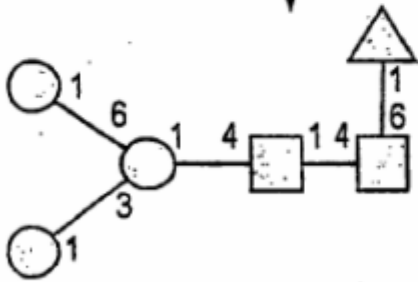


Fig. 5d

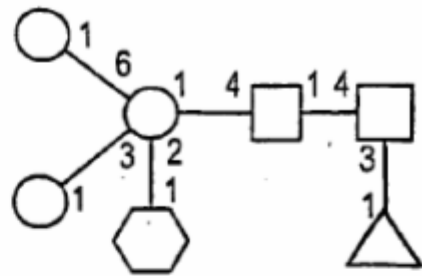


Estructura de glucano principal de células CHO

Remodelación de glucano con glucosidasas



Estructura de glucano remodelada principal en Cerezyme



Estructura de glucano principal de células de zanahoria:

Glucano terminal de manosa

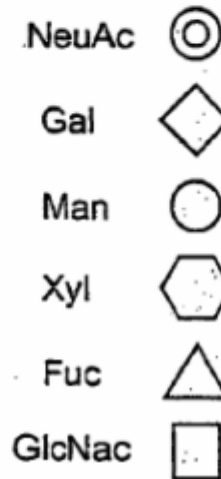


Fig. 6

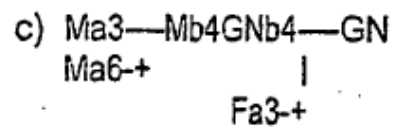
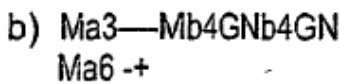
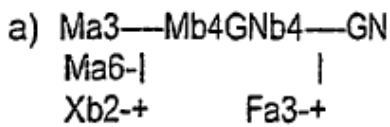
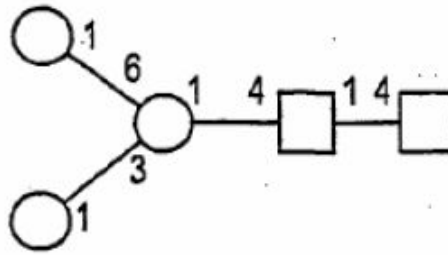
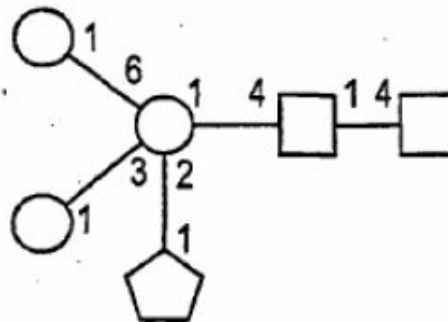


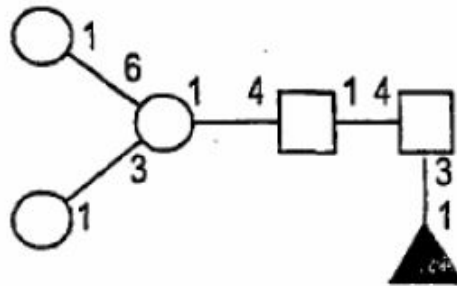
Fig. 7



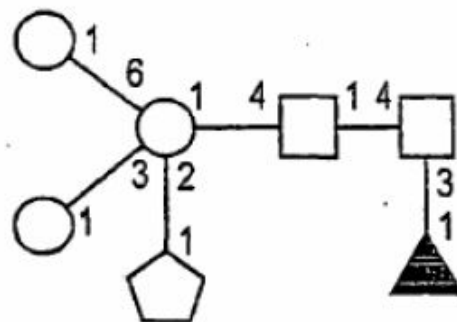
Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.171,5$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.331,6$

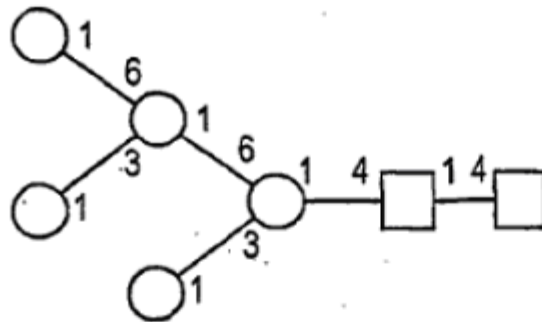


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.345,6$

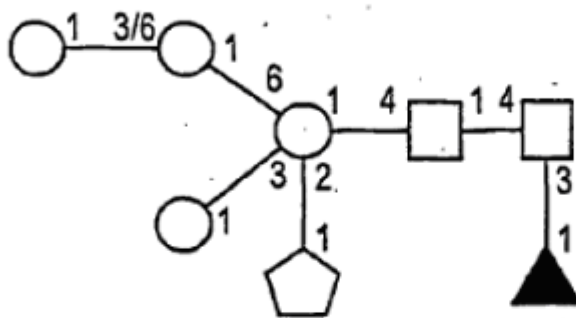


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.505,7$

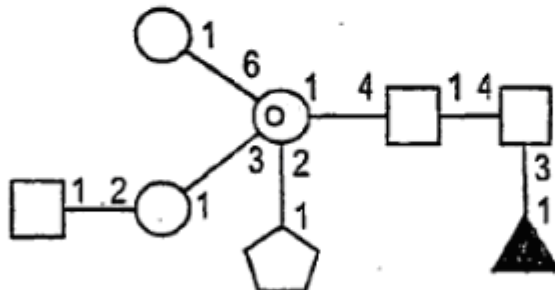
Fig. 8a



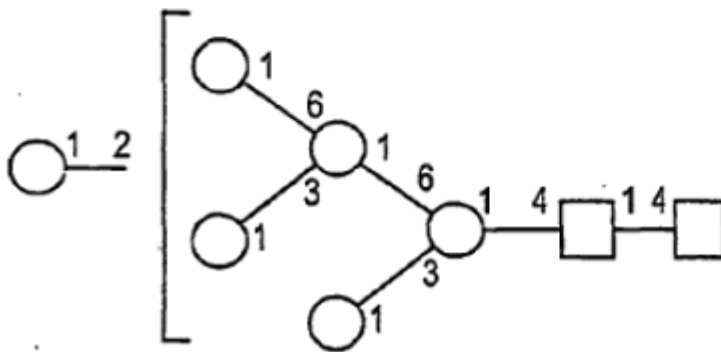
Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.579,8$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.709,7$

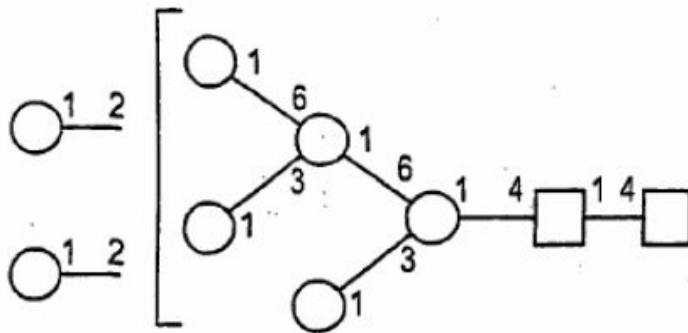


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.750,9$

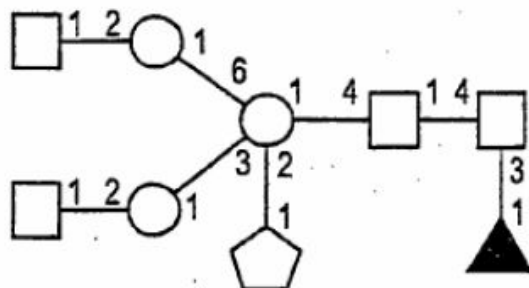


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.783,9$

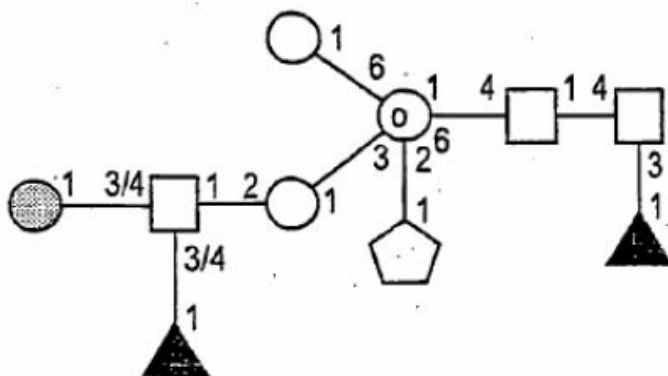
Fig. 8b



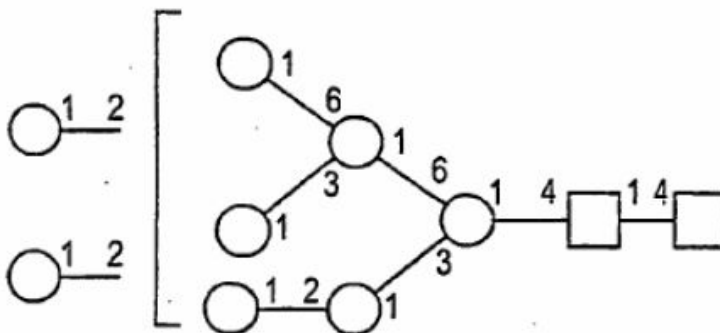
Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.989,0$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 1.997,0$

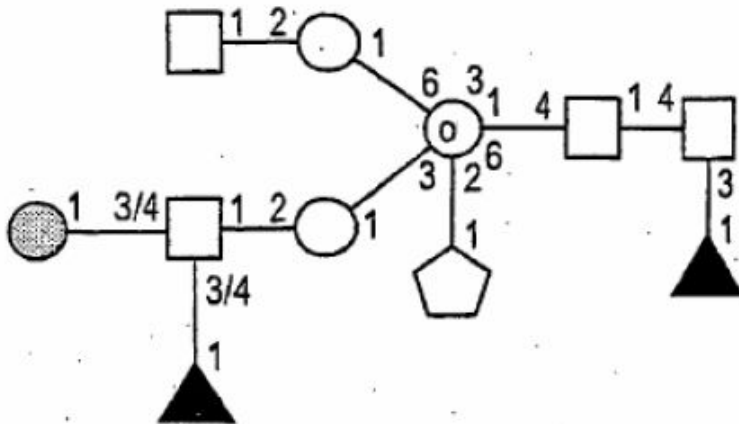


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 2.130,0$

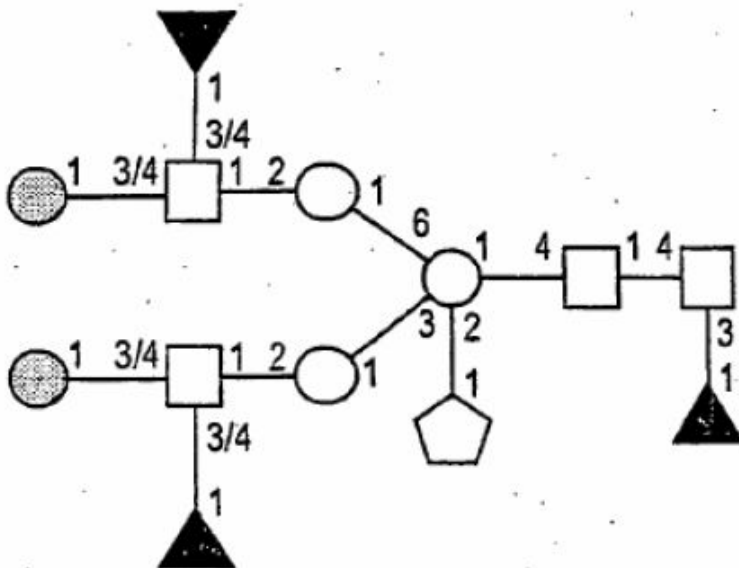


Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 2.193,1$

Fig. 8c



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 2.375,2$



Masa monoisotópica teórica para el ión molecular $[M+Na]^+ = 2.375,2$






- Leyenda:
-  Fucosa
 -  Galactosa
 -  *N*-acetilglucosamina
 -  Manosa
 -  Xilosa

Fig. 8d