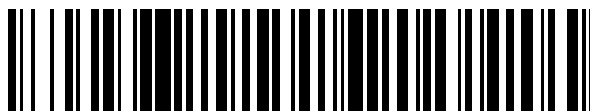


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 292**

51 Int. Cl.:

C12N 9/40 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.1997 E 04030107 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 1538202**

54 Título: **Producción de α -galactosidasa A humana**

30 Prioridad:

13.09.1996 US 712614

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

30.04.2014

73 Titular/es:

**SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.
(100.0%)
300 Shire Way
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**SELDEN, RICHARD F.;
BOROWSKI, MARIANNE;
TRECO, DOUGLAS A.;
GILLESPIE, FRANCES P.;
KINOSHITA, CAROL M. y
WILLIAMS, MELANIE D.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 458 292 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 α -galactosidasa A humana.

5 **[0001]** Esta invención se refiere a la α -galactosidasa A y el tratamiento para la deficiencia de α galactosidasa A.

10 **[0002]** La enfermedad de Fabry es una enfermedad de depósito lisosomal hereditaria ligada al cromosoma X que se caracteriza por síntomas tan graves como insuficiencia renal, angioqueratomas y anomalías cardiovasculares, incluyendo la dilatación ventricular y la insuficiencia de la válvula mitral. La enfermedad también afecta al sistema nervioso periférico, provocando episodios de dolor ardiente agónicos en las extremidades. La enfermedad de Fabry es causada por una deficiencia en la enzima α -galactosidasa A (α -gal A), lo que resulta en un bloqueo del catabolismo de los glicosfingolípidos neutros y la acumulación del sustrato de la enzima trihexósido ceramida dentro de las células y en el torrente sanguíneo.

15 **[0003]** Debido al patrón de herencia ligada al cromosoma X de la enfermedad, esencialmente todos los pacientes de la enfermedad de Fabry son hombres. Aunque se han observado unos heterocigotos hembras gravemente afectados, los heterocigotos hembras son generalmente asintomáticos o tienen síntomas relativamente leves limitados en gran medida a una opacidad característica de la córnea. Una variante atípica de la enfermedad de Fabry, exhibiendo actividad α -gal A residual baja y, o bien síntomas muy leves o aparentemente sin otros síntomas característicos de la enfermedad de Fabry, se correlaciona con la hipertrofia ventricular izquierda y enfermedad cardíaca (Nakano et al., Nueva Engl. J. Med. 333:288-293, 1995). Se ha especulado que la reducción de α -gal A puede ser la causa de tales anomalías cardíacas.

25 **[0004]** El ADNc y la codificación del gen humano α -gal A se han aislado y secuenciado (Bishop et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 83:4859, 1986; Kornreich y col, Nuc. Acids Res. 17:3301, 1988; Oeltjen et al, Genoma mamífero 6: 335-338, 1995). El α -gal A humano se expresa como un polipéptido de 429-aminoácidos, de los cuales el N-terminal de 31 aminoácidos constituye un péptido señal. La enzima humana se ha expresado en las células de ovario de hámster chino (CHO) (Desnick, patente de EE.UU. N ° 5.356.804; Ioannou et al., J. Cell Biol. 119:1137, 1992); células de insecto (Calhoun et al, Patente de EE.UU. No. 5.179.023); y células COS (Tsuji et al., Eur. J. Biochem. 165:275, 1987). Se ha informado de pruebas piloto de terapias de reemplazo de α -gal A, utilizando proteínas derivadas de tejidos humanos (Mapes et al.Science 169:987, 1970; Brady et al, N. Engl. J. Med. 289:9, 1973; Desnick et al, Proc. Natl. Acad. Ciencia EE.UU. 76:5326, 1979), pero actualmente no hay tratamiento efectivo para la enfermedad de Fabry.

35 Resumen de la invención

40 **[0005]** Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de producción de α -gal A humano purificado, comprendiendo (a) cultivar una célula humana modificada por ingeniería genética para sobreexpresar y secretar α -gal A humano en un medio, (b) recoger el medio que comprende el α -gal A humano a partir de dichas células cultivadas, y (c) purificar α -gal A humano del medio por (i) pasar el medio a través de una resina de interacción hidrófoba y eluyendo α -gal A humano de la resina, y (ii) pasar el α -gal A humano que se eluyó por columnas que contienen una resina de heparina inmovilizada, hidroxipatita, una resina de intercambio aniónico y una resina de exclusión de tamaño y eluyendo α -gal A humano purificado de la columna final, en la que el α -gal A humano purificado este libre de agentes de afinidad de lectina proteica y agentes análogos de sustrato α -gal A.

45 **[0006]** La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un α -gal A humano purificado de enzima glicosilada para su uso en terapia de reemplazo enzimático en una deficiencia en α -gal A, en la que dicha composición este libre de (i) agentes de afinidad de lectina proteináceas y (ii) agentes analógicos de sustrato de α -gal A.

50 **[0007]** Se ha encontrado que la expresión de un ADN que codifica α -gal A humano en las células humanas cultivadas produce un polipéptido que está glicosilado adecuadamente, de modo que no es sólo enzimáticamente activo y capaz de actuar sobre el sustrato glicosfingolípidos que se acumula en la enfermedad de Fabry, sino que también es internalizado eficazmente por las células a través de receptores de la superficie celular que apuntan exactamente a donde se necesita en esta enfermedad: el compartimiento lisosomal de las células afectadas, particularmente las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos del paciente. Este descubrimiento, que se analiza con más detalle más adelante, significa que un individuo sospechoso de tener una deficiencia de α -gal A tal como la enfermedad de Fabry, puede ser tratado con α -gal A humano purificado obtenido a partir de células humanas cultivadas modificadas genéticamente.

60 **[0008]** Cuando las células se van a modificar genéticamente para los fines de tratamiento de la enfermedad de Fabry por la terapia de reemplazo de la enzima, una molécula de ADN que contiene un ADNc de α -gal A o una secuencia de ADN genómico puede estar contenida dentro de una construcción de expresión e introducida en células humanas primarias o secundarias (por ejemplo, fibroblastos, células epiteliales incluyendo células mamarias y células epiteliales intestinales, células endoteliales, elementos formados de la sangre incluyendo linfocitos y células de la médula ósea, células gliales, hepatocitos, queratinocitos, células musculares, células neurales o los

precursores de estos tipos de células) por métodos de transfección estándar, incluyendo, pero no limitados a, liposomas, polibreno, o transfección mediada por dextrano DEAE, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, o microproyectiles impulsados por velocidad ("biolística"). Alternativamente, se podría usar un sistema que proporcione ADN mediante un vector viral. Los virus conocidos por ser útiles para la transferencia génica incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes, virus de las paperas, virus de la polio, retrovirus, virus Sindbis y virus de vaccinia tales como el virus de la viruela del canario.

[0009] También se pueden utilizar células humanas inmortalizadas. Ejemplos de líneas celulares humanas inmortalizadas útiles en los presente métodos incluyen, pero no se limitan a, células de melanoma de Bowes (N° de Acceso ATCC CRL 9607), células Daudi (N° de Acceso ATCC CCL 213), células HeLa y derivados de células HeLa (N° de Acceso ATCC CCL 2, CCL 2.1, y CCL 3 2.2), células HL-60 (N° de Acceso ATCC CCL 240), células HT1080 (N° Acceso ATCC CCL 121), células Jurkat (N° de acceso ATCC TIB 152), células de carcinoma KB (N° de Acceso ATCC CCL 17), células de leucemia K - 562 (N° de Acceso ATCC CCL 243), células de cáncer de mama MCF-7 (N° de Acceso ATCC BTH 22), células MOLT-4 8 (No. de Acceso ATCC 1582), células Namalwa (N° de Acceso ATCC CRL 1432), células Raji (N° de Acceso ATCC CCL 86), células RPMI 8226 (N° de Acceso ATCC CCL 155), células U-937 (N° de Acceso ATCC CRL 1593), células 2R4 sublínea WI - 38VA13 (N° de Acceso ATCC CLL 75.1), y células de carcinoma de ovario 2780AD (Van der Blick et al., Cancer Res. 48:5927-5932, 1988), así como células de heterohibridoma producidas por fusión de células humanas y células de otras especies. Cepas de fibroblastos humanos secundarios, tales como WI-38 (No. de Acceso ATCC CCL 75) y también se pueden usar MRC-5 (N° de Acceso ATCC CCL 171).

[0010] Siguiendo la ingeniería genética de células humanas con una molécula de ADN que codifica α -gal A (o siguiendo otra modificación genética adecuada, tal como se describe más adelante) para producir una célula que sobreexpres y secrete α -gal A, una cepa celular clonal que consiste esencialmente en una pluralidad de células humanas primarias cultivadas genéticamente idénticas o, donde las células sean inmortalizadas; puede generarse una línea celular clonal que consista esencialmente en una pluralidad de células humanas inmortalizadas genéticamente idénticas. Preferiblemente, las células de la cepa celular clonal o línea celular clonal son fibroblastos.

[0011] El método de la invención no depende de la posible disponibilidad inconsistente de fuentes de tejidos apropiadas y por tanto es un medio comercialmente viable de tratamiento de la deficiencia de α -gal A. Es relativamente libre de riesgo en comparación con la terapia de reemplazo de enzima con enzimas derivadas de tejidos humanos que pueden estar infectados con virus conocidos o desconocidos y con otros agentes infecciosos.

[0012] Como se describió anteriormente, los individuos con deficiencias de α -gal A se pueden tratar con α -gal A purificado (es decir, terapia de reemplazo de enzima). Las células humanas primarias, secundarias o inmortalizadas modificadas genéticamente para sobreexpresar α -gal A humano serán útiles para la producción de proteína in vitro, para producir proteína que se puede purificar para terapia de reemplazo de la enzima. Las células humanas secundarias o inmortalizadas pueden ser elegidas entre las descritas anteriormente y pueden estar modificadas genéticamente por la transfección o transducción de métodos también descritos anteriormente. Después de la modificación genética, las células se cultivan bajo condiciones que permiten la sobreexpresión y la secreción de α -gal A. La proteína se aísla de las células cultivadas recogiendo el medio en el que se cultivan las células, y/o mediante lisis de las células para liberar su contenido y a continuación, la aplicación de técnicas de purificación de proteínas convencionales. Una de estas técnicas consiste en pasar el medio de cultivo, o cualquier muestra que contenga α -gal A humano a través de una resina de interacción hidrófoba, tal como Butilo Sepharose® u otra resina que tenga un resto funcional que incluya un tipo de butilo. Hacer pasar la muestra a través de una resina de este tipo puede constituir el primer paso cromatográfico. Si se requiere una purificación adicional, el material que contiene α -gal A eludido de la resina de interacción hidrófoba se puede pasar a través de una columna que contiene una segunda resina, tal como una resina de heparina inmovilizada como Heparina Sepharose®, hidroxapatito, una resina de intercambio aniónico como Q Sepharose®, o una resina de exclusión de tamaño como Superdex® 200. Preferiblemente, el protocolo de purificación incluirá el uso de cada uno de los tipos anteriores de resinas.

[0013] Los métodos anteriores para la preparación de α -gal A con pureza relativamente alta dependían del uso de afinidad cromatografía, utilizando una combinación de cromatografía de afinidad de lectina (concanavalina A (Con A) Separose) y cromatografía de afinidad basada en la unión de α -gal A al análogo de sustrato N-6- aminohexanoil-a-D-galactosamina junto a una matriz de Separose (Bishop et al., J. Biol. Chem. 256:1307-1316, 1981). El uso de resinas de afinidad de lectina proteináceas y resinas de análogo de sustrato está típicamente asociado con la lixiviación continua del agente de afinidad del soporte sólido (Cf. Marikar et al., Anal. Biochem 201:306-310, 1992), lo que resulta en la contaminación del producto purificado con el agente de afinidad sea este libre en solución o unido a la proteína eluída. Tales contaminantes hacen que el producto sea inadecuado para su uso en preparaciones farmacéuticas. Análogos y lectinas de sustrato consolidados también pueden tener efectos negativos sobre las propiedades enzimáticas, funcionales y estructurales de las proteínas. Además, tales resinas de afinidad son típicamente costosas de preparar, haciendo que el uso de tales resinas menos adecuado para la producción a escala comercial que resinas de cromatografía más convencionales. Por lo tanto, el desarrollo de un protocolo de purificación utilizando resinas de cromatografía convencionales, que son fácilmente disponibles en los suministros y la calidad adecuada para su uso comercial a gran escala, es una ventaja significativa de la presente invención.

[0014] Un individuo que se sospecha que tiene deficiencia de α -gal A se puede tratar mediante la administración de α -gal A humano purificado farmacéuticamente aceptable por cualquier método estándar, incluyendo, pero no limitado a, inyección intravenosa, subcutánea, o intramuscular, o como un implante sólido. La proteína purificada se puede formular en una composición terapéutica que consiste en una solución acuosa que contiene un excipiente fisiológicamente aceptable, por ejemplo, un portador tal como albúmina de suero humana, a 6,5 pH o por debajo.

[0015] La presente invención por lo tanto proporciona un medio para obtener grandes cantidades de α -gal A humano apropiadamente glicosilado y, por tanto, de utilidad terapéutica. Esto hace que la terapia de reemplazo de enzimas para la deficiencia de α -gal A sea comercialmente viable, así como relativamente libre de riesgo en comparación con la terapia con enzima derivada de tejidos humanos o animales.

[0016] Los artesanos expertos reconocerán que la secuencia de ADN de α -gal A humano (ADNc o ADN genómico), o secuencias que difieren de ella ya sea debido a cambios de codones silenciosos o a cambios de codones que producen sustituciones de aminoácidos conservadores, se pueden utilizar para modificar genéticamente células humanas cultivadas de modo que se sobreexpresen y secreten la enzima. También es posible que ciertas mutaciones en la secuencia de ADN de α -gal A codifiquen polipéptidos que retienen o exhiben una mejora en la actividad enzimática de α -gal A (como sería evidente mediante la expresión de la molécula de ADN mutante en células cultivadas, purificando el polipéptido codificado y midiendo la actividad catalítica, como se describe en el presente documento). Por ejemplo, se esperaría que sustituciones de aminoácidos conservadores tengan poco o ningún efecto sobre la actividad biológica, particularmente si representan menos del 10% del número total de residuos en la proteína. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina, y fenilalanina, tirosina.

[0017] La producción de α -gal A por las células se puede maximizar mediante ciertas manipulaciones genéticas. Por ejemplo, la molécula de ADN que codifica α -gal A también puede codificar un péptido señal heterólogo, tal como el péptido señal de la hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina, Factor VIII, Factor IX, glucagón, el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), o una enzima lisosomal que no sea α -gal A. Preferentemente, el péptido señal es el péptido señal de hGH (SEQ ID No: 21), y esta en el extremo N-terminal de la proteína codificada. La secuencia de ADN que codifica el péptido señal puede contener un intrón tal como el primer intrón del gen hGH, dando como resultado una secuencia de ADN tal como SEQ ID NO: 27 (véase también la Fig. 10). Además, la molécula de ADN también puede contener una secuencia 3' no traducida (UTS) que es al menos de 6 nucleótidos de longitud (en contraste con la de α -gal A mRNA que se encuentra en los seres humanos, que no tiene 3' UTS, el sitio de poliadenilación requisito que está dentro de la secuencia de codificación). La UTS se coloca inmediatamente a 3' al codón de terminación de la secuencia de codificación, e incluye un sitio de poliadenilación. Es preferiblemente al menos 6 nucleótidos de longitud, más preferiblemente al menos 12 y lo más preferible al menos 30 y en todos los casos contiene la secuencia AATAAA o una secuencia relacionada que sirve para promover la poliadenilación. Una molécula de ADN tal como se describe, es decir, que codifica un péptido señal de hGH enlazado a α -gal A y que contiene un 3' UTS que incluye un sitio de poliadenilación, y preferiblemente incluye secuencias de control de la expresión, se puede utilizar para practicar la invención.

[0018] Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, y a partir de las reivindicaciones.

[0019] El término "genéticamente modificado", como se usa en el presente documento en referencia a células, se entiende que abarca células que expresan un producto génico particular tras la introducción de una molécula de ADN que codifica el producto génico y/o elementos reguladores que controlan la expresión de una secuencia de codificación. La introducción de la molécula de ADN puede llevarse a cabo por la selección del gen (es decir, la introducción de una molécula de ADN a un sitio genómico particular) además la recombinación homóloga permite la sustitución del propio gen defectuoso (el gen α -gal A defectuoso parte de él podría ser sustituido en pacientes con la enfermedad de Fabry con las propias células con todo el gen o una porción del mismo)).

[0020] El término " α -gal A", como se usa aquí, significa α -gal A sin un péptido señal, es decir, SEQ ID NO: 26 (Fig. 9). Hay alguna indicación de que los residuos 371 a 398 o 373 a 398 de SEQ ID NO: 26 (Fig. 9) pueden ser retirados en el lisosoma; sin embargo, la eliminación de este propéptido putativo no se cree que afecte a la actividad de la enzima. Esto sugiere que cualquier porción del propéptido putativo podría suprimirse sin afectar a la actividad. Por lo tanto, el término " α -gal A" tal como se usa en el presente documento también cubre una proteína que tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 26, excepto que carece de hasta 28 residuos en el terminal-C de esa secuencia.

[0021] Por deficiencia " α -gal A" se entiende cualquier deficiencia en la cantidad o actividad de esta enzima en un paciente. La deficiencia puede provocar síntomas graves como los normalmente observados en hombres que sufren la enfermedad de Fabry, o pueden ser sólo parciales e inducir síntomas relativamente leves, como pueden verse en mujeres heterocigotas portadoras del gen defectuoso.

[0022] Como se usa en este documento, el término "célula primaria" incluye células presentes en una suspensión

de células aisladas de una fuente de tejido vertebrado (antes de ser chapado, es decir, unido a un sustrato de cultivo de tejido, como un plato o recipiente), células presentes en un explante derivado del tejido, ambas de los tipos anteriores de células cultivadas en placas por primera vez y suspensiones de células derivadas a partir de estas células cultivadas en placas.

5 [0023] "Células secundarias" se refieren a células en todas las etapas posteriores en el cultivo. Es decir, que la primera vez que una célula primaria en placa se retira del sustrato de cultivo y es colocada en placa de nuevo (traspasada), se conoce como una célula secundaria, como son todas las células en trasposos posteriores.

10 [0024] Una "cepa celular " consta de células secundarias que han sido traspasadas una o más veces; exhiben un número finito de duplicaciones de la población media en el cultivo; exhiben propiedades de contacto inhibido, crecimiento dependiente del anclaje (excepto para las células propagadas en cultivo en suspensión) y no están inmortalizadas.

15 [0025] Por " célula inmortalizada " se entiende una célula de una línea celular establecida que presenta una vida útil aparentemente ilimitada en el cultivo.

[0026] Por " péptido de señal " se entiende una secuencia de péptido que dirige un polipéptido recién sintetizado al que está adjunto al retículo endoplásmico para su posterior procesamiento post-traducción y / o distribución.

20 [0027] El término " péptido señal heterólogo", tal como se usa en el presente documento en el contexto de α -gal A, significa un péptido señal que no es el péptido señal α -gal A humano (es decir, codificado por los nucleótidos 36-128 de la SEQ ID NO: 18). Por lo general es el péptido señal de algunas proteínas de mamíferos que no son α -gal A.

25 [0028] El término " paso de cromatografía primero " se refiere a la primera aplicación de una muestra a una columna de cromatografía (se excluyen todos los pasos asociados con la preparación de la muestra).

Breve Descripción de los Dibujos

30 [0029]

Figura. 1 es una representación de la sonda 210 bp que se usó para aislar α -gal A partir de una biblioteca de ADNc de fibroblastos humanos (SEQ ID NO: 19). La secuencia es desde el exón 7 del gen de α -gal A. La sonda se aisló a partir del ADN genómico humano por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las regiones subrayadas en la

35 figura corresponden a las secuencias de los cebadores de amplificación.

Figura. 2 es una representación de la secuencia del fragmento de ADN que completa el extremo 5' de clon de ADNc de α -gal A (SEQ ID NO: 20). Este fragmento se amplificó a partir de ADN genómico humano por PCR. Las regiones subrayadas corresponden a las secuencias de los cebadores de amplificación. Las posiciones de los sitios de endonucleasas de restricción NcoI y SacII, que se usaron para la subclonación tal como se describe en el Ejemplo IA, también se muestran.

40 Figura. 3 es una representación de la secuencia de ADNc de α -gal A, incluyendo la secuencia que codifica el péptido señal (SEQ ID NO: 18).

Figura. 4 es un mapa esquemático de pXAG - 16, un constructo de expresión α -gal A que incluye el CMV (citomegalovirus) promotor y el intrón, la secuencia de codificación del péptido señal hGH y el primer intrón, el ADNc para α -gal A (es decir, que carece de la secuencia del péptido señal de α -gal A) y los 3' de UTS de hGH.

45 Figura. 5 es un mapa esquemático de pXAG - 28, un constructo de expresión α -gal A que incluye el colágeno Ia2 promotor, un intrón β - actina, la secuencia de codificación del péptido señal hGH y el primer intrón, el ADNc para α -gal A (es decir, que carece de la secuencia del péptido señal de α -gal A) y los 3' de UTS de hGH

50 Figura. 6 es un cromatograma de paso de purificación de α -gal A utilizando una resina de Butilo Sepharose®. Se muestran la absorbancia a 280 nm (línea de corriente) y la actividad de α -gal A (línea de puntos) de las fracciones seleccionadas.

Figura. 7 es un gráfico de líneas que representa la interiorización por los fibroblastos de Fabry de α -gal A humanos preparados de acuerdo con la invención. La actividad intracelular α -gal A y la concentración total de proteína se midieron después de la incubación de las células con concentraciones crecientes de α -gal A humano preparados de acuerdo con la invención. Se muestran los efectos de los inhibidores de la internalización potenciales de fosfato de manosa - 6 (M6P; rombos abiertos) y manano (círculos abiertos).

55 Figura. 8 es un diagrama esquemático del paradigma experimental diseñado para examinar fibroblastos de Fabry después de la internalización de α -gal A. La actividad de α -gal A de las células de Fabry se mide después de la exposición de fibroblastos humanos, ya sea normal o sobre expresando α -gal A cultivados en insertos Transwell. "M6P" = manosa - 6 fosfato; "Untrf HF " = fibroblastos humanos no transfectados; " BRS11 " = una cepa de fibroblastos transfectada, α -gal A sobreexpresada.

60 Figura. 9 es una representación de la secuencia de aminoácidos de α -gal A humano (SEQ ID NO: 26).

Figura. 10 es una representación de la secuencia de ADN que codifica el péptido señal de hGH y que contiene el primer intron de hGH (subrayado) (SEQ ID NO: 27).

65 Figura. 11 es una representación de la secuencia de ADN que codifica el péptido señal de hGH sin el intrón (SEQ ID NO: 22).

Figura. 12 es una representación de la secuencia de aminoácidos de la señal de péptido de hGH (SEQ ID NO: 21).
Figura. 13 es una representación de la secuencia de ADNc que codifica α -gal A humano (sin péptido señal) (SEQ ID NO: 25).

5 Descripción detallada

10 **[0030]** Enzimas lisosomales tales como α -gal A se dirigen al compartimento lisosomal de una célula a través de la interacción con el receptor de manosa-6-fosfato (M6P), que se une a residuos de M6P presentes en los restos de oligosacáridos de enzimas destinadas al compartimento lisosomal (Kornfeld, S. y Mellman, I, Ann. Rev. Cell. Biol 5:483-525, 1989).

15 La interacción primaria se produce en el aparato de Golgi, donde las enzimas unidas a receptores de M6P de Golgi se segregan para el transporte a los lisosomas. Un tipo secundario de interacción se cree que tiene lugar entre α -gal A extracelular y receptores M6P en la superficie celular. Sustancias extracelulares internalizadas por las células se transportan a través del citoplasma en vesículas endocíticas, que se fusionan con los lisosomas primarios y vierten su contenido en los lisosomas. En este proceso, los receptores M6P de la superficie celular también se incorporan en las vesículas endocíticas y se transportan a los lisosomas.

20 **[0031]** Cualquier α -gal A presente en el medio extracelular puede, si lleva residuos de M6P, unirse a los receptores M6P de la superficie celular y por lo tanto ser transportado al compartimento lisosomal junto con los receptores. Una vez en el compartimento lisosomal como resultado de esta vía limpiadora, la enzima puede llevar a cabo su función apropiada. Por lo tanto, incluso si una célula es genéticamente deficiente en la producción de su propia α -gal A, existe un mecanismo para que absorba enzima producida exógenamente, siempre que (a) la enzima este glicosilada adecuadamente y (b) la célula deficiente lleve receptores de M6P.

25 **[0032]** En la enfermedad de Fabry, se ha demostrado que las células endoteliales vasculares del riñón y el corazón muestran anomalías histopatológicas severas y contribuyen a la patología clínica de la enfermedad; estas células, que son portadoras de receptores M6P, son un objetivo particular de la invención actualmente reivindicada. El α -gal A producido de acuerdo con la invención se puede administrar mediante rutas farmacológicas convencionales de administración. Un α -gal A en el que M6P está presente en los oligosacáridos N-unidos, es por tanto de gran importancia para la terapia de conformidad con la invención.

30 **[0033]** Además, el grado en que los oligosacáridos N-unidos de α -gal A se modifican mediante la sialilación es también de gran importancia. En ausencia de sialilación apropiada, α -gal A será eliminado rápidamente de la circulación debido a la unión por los receptores de asialoglicoproteína hepáticos, seguido por la internalización y degradación por hepatocitos (Ashwell y Harford, Ann. Rev. Biochem. 51:531-554, 1982). Esto disminuye la cantidad de α -gal A disponible en la circulación para la unión a los receptores de M6P en células que contribuyen a la patología clínica de la enfermedad de Fabry, tales como las células endoteliales vasculares de riñón y el corazón. Sorprendentemente, los Solicitantes han encontrado que α -gal A secretado por células humanas transfectadas establemente tiene propiedades de glicosilación que son adecuadas para el tratamiento de la enfermedad de Fabry ya sea por cualquiera de terapia génica o por administración farmacéutica convencional de la proteína secretada purificada. Esto está en contraste con la situación de la enzima lisosómica mejor estudiada, la glucocerebrosidasa, en la que la secreción de la enzima purificada a partir de placenta humana o secretada desde células CHO transfectadas a las células relevantes clínicamente en el cuerpo requiere modificación enzimática compleja de la enzima después de la purificación (véase Beutler, New Engl. J. Med. 325:1354-1360, 1991).

35 **[0034]** La terapia puede llevarse a cabo mediante la introducción en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de α -gal A humano purificado obtenido a partir de cultivos de células humanas modificadas genéticamente para sobreexpresar y secretar la enzima. Técnicas para llevar a cabo las modificaciones genéticas necesarias se discuten a continuación, así como los métodos de purificación, formulación y tratamiento.

Ejemplos I. Preparación y uso de construcciones diseñadas para liberar y expresar α -gal A

40 **[0035]** Se construyeron dos plásmidos de expresión, pXAG -16 y pXAG -28. Estos plásmidos contienen ADNc α -gal A humano que codifica los 398 aminoácidos de la enzima α -gal A (sin la péptido señal α -gal A); la secuencia de ADN genómico del péptido señal de la hormona de crecimiento humano (hGH), que es interrumpida por el primer intrón del gen de hGH y la secuencia 3' no traducida (UTS) del gen de hGH, que contiene una señal para la poliadenilación. El plásmido pXAG - 16 tiene el promotor de citomegalovirus humano temprano inmediato (IE de CMV) y el primer intrón (flanqueado por secuencias no codificantes del exón) , mientras que el pXAG - 28 es impulsado por el promotor colágeno Ia2 y también contiene la UTS 5' del gen de β - actina , que contiene el primer intrón del gen de la β - actina .

A. Clonación del ADNc de α -gal A completo y Construcción de plásmido de expresión pXAG – 16 de α -gal A

65 **[0036]** El ADNc de α -gal A humano se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de fibroblastos humanos que se construyó como sigue. Poli - A + ARNm fue aislado de ARN total y la síntesis de ADNc se realizó utilizando reactivos

para un sistema lambda ZapII® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene Inc., La Jolla, CA). En pocas palabras, " la primera cadena " de ADNc fue generada por transcripción inversa en presencia de un cebador oligo - dT que contiene un sitio endonucleasa de restricción XhoI interno. Después del tratamiento con RNasa H, el ADNc se mella con ADN polimerasa I para generar ADNc de doble cadena. Este ADNc se hizo de extremos romos con T4 ADN polimerasa y se ligó a adaptadores de EcoRI. Los productos de esta ligación se trataron con ADN quinasa de T4 y se digirieron con XhoI. El ADNc se fraccionó mediante cromatografía Sephacryl® -400. Fracciones grandes y medianas se reunieron y los ADNc se ligaron a brazos EcoRI y Lambda ZAPII Digeridos con XhoI. Los productos de esta ligación se envasaron y titularon. La biblioteca primaria tenía un título de 1,2 x 10⁷ ufp / ml y un tamaño medio de inserto de 925 pb.

[0037] Una sonda de 210 pb del exón 7 del gen humano α -gal A (Fig. 1, SEC ID N°: 19) se utilizó para aislar el ADNc. La propia sonda se aisló a partir de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleótidos :

5' - CTGGGCTGTAGCTATGATAAAC - 3' (Oligo 1 ; SEQ ID NO : 1) y 5' - TCTAGCTGAAGCAAACAGTG - 3' (Oligo 2 ; SEC ID N°: 2) . El producto de PCR se utilizó para rastrear la biblioteca de ADNc de fibroblastos y los clones positivos fueron aislados y caracterizados seguidamente. Un clon positivo, el fago 3A, se sometió al protocolo de escisión del sistema ZapII® lambda (Stratagene, Inc., La Jolla, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este procedimiento produjo el plásmido pBSAG3A, que contiene la secuencia de ADNc de α -gal A en la columna vertebral plásmida pBluescriptSK⁻. Secuenciación de ADN reveló que este plásmido no contenía el extremo 5' completo de la secuencia de ADNc. Por lo tanto, el extremo 5' se reconstruyó usando un fragmento de PCR amplificado a partir de ADN genómico humano. Para lograr esto, un fragmento de ADN genómico de 268 pb (Fig. 2 , SEC ID N°: 20) se amplificó usando los siguientes oligonucleótidos : 5' - ATTGGTCCGCCCTGAGGT - 3' (Oligo 3 , SEC ID N°: 3) y 5' - TGATGCAGGAATCTGGCTCT - 3' (Oligo 4 ; SEQ ID NO : 4) . Este fragmento se subclonó en un plásmido de clonación " TA " (Invitrogen Corp., San Diego, CA) para generar plásmido pTAAGEI. El plásmido pBSAG3A, que contiene la mayoría de la secuencia de ADNc de α -gal A y pTAAGEI, que contiene el extremo 5' de ADNc α -gal A, fueron cada uno de ellos digeridos con SacII y NcoI. Las posiciones de los sitios SacII y NcoI relevantes dentro del fragmento de ADN amplificado se muestran en la Figura. 2. Se aisló el fragmento de 0,2 kb SacII - NcoI de pTAAGEI y se ligó a pBSAG3A equivalentemente digerido. Este plásmido pAGAL, contiene la secuencia de ADNc de α -gal A completa, incluyendo la secuencia que codifica el péptido señal de α -gal A. El ADNc se secuenció completamente (se muestra en la Figura. 3 incluyendo el péptido señal de α -gal A; SEQ ID NO: 18) y se encontró que era idéntica a la secuencia publicada para el ADNc α -gal A humano (GenBank secuencia HUMGALA).

[0038] El plásmido pXAG - 16 fue construido a través de varios intermedios, como sigue. En primer lugar, se digirió pAGAL con SacII y XhoI y extremos romos. En segundo lugar, los extremos del ADNc de α -gal A completos se ligaron a enlazadores XbaI y se subclonaron en pEF - BOS digeridos en XbaI (Mizushima et al. Nucl . Acids. Res. 18:5322, 1990), creando pXAG - 1. Esta construcción contiene el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) UTS 3' y el promotor del factor-1 α de elongación humana (EF -1 α) que flanquea el ADNc que codifica α -gal A más el péptido señal de α -gal A, de tal manera que el extremo 5' de ADNc de α -gal A se fusiona con el promotor EF -1 α . Para crear una construcción con el promotor CMV IE y el primer intrón, el ADNc de α -gal A y G - CSF UTS 3' se retiraron de pXAG - 1 como un fragmento XbaI -BamHI de dos kb. El fragmento fue con extremos romos, se ligó a engarces BamHI y se insertó en pCMVflpNeo digerido con BamHI (que se construyó tal como se describe a continuación). La orientación era tal que el extremo 5' de ADNc de α -gal A se fusionó a la región del promotor IE de CMV.

[0039] El pCMVflpNeo fue creado de la siguiente manera. Un fragmento de promotor del gen CMV IE se amplificó por PCR utilizando ADN genómico CMV como plantilla y los oligonucleótidos: 5' - TTTTGGATCCCTCGAGGACATTGATTATTGACTAG - 3' (SEC ID N°: 23) y 5' - TTTTGGATCCCGTGTCAAGGACGGTGAC - 3' (SEQ ID NO: 24). El producto resultante (un fragmento de 1,6 kb) se digirió con BamHI, dando un fragmento que contiene el promotor CMV con extremos cohesivos digeridos con BamHI. La unidad de expresión neo se aisló del plásmido pMCIneoA (Stratagene Inc., La Jolla, CA) como un fragmento 1,1 kb XhoI - BamHI. Los neo fragmentos que contienen el promotor de CMV se insertaron en plásmido BamHI digerido con XhoI (pUC12). Notablemente , pCMVflpNeo contiene la región del promotor IE de CMV , comenzando en el nucleótido 546 y terminando en el nucleótido 2105 (de la secuencia de Genbank HS5MIEP) y el gen de resistencia a la neomicina impulsado por el virus del herpes simple (HSV) promotor de quinasa timidina (el gen TKNEO) inmediatamente 5' al fragmento del promotor IE de CMV . La dirección de la transcripción del gen neo es la misma que la del fragmento de promotor de CMV. Este constructo intermedio se denominó pXAG - 4.

[0040] Para añadir los 3' de hGH UTS , el G-CSF UTS 3' fue retirado de pXAG - 4 como un fragmento XbaI - SmaI y los extremos de pXAG - 4 se hicieron romos . Los 3' de hGH UTS fueron retirados de pXGH5 (Selden et al. Mol . Biol. Celular. 6:3173-3179 ,1986) como un fragmento SmaI -EcoRI de 0,6 kb. Después de hacer romo el extremo de este fragmento, se ligó en pXAG - 4 inmediatamente después que el sitio XbaI de extremos romos de pXAG - 4. Este intermedio se llamó pXAG - 7. El fragmento TKNEO fue retirado de este plásmido como un fragmento HindIII - ClaI y los extremos del plásmido se hicieron romos por " llenado" con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I. Un gen de resistencia a neomicina dirigido por el promotor temprano de SV40 se ligó como un fragmento en romo ClaI - BsmBI de un digesto de pCDNeo (Chen et al. Mol . Biol. Celular. 7:2745-2752, 1987), colocando la unidad de

transcripción neo en la misma orientación que la unidad de transcripción del α -gal A. Este intermedio se llamó pXAG -13.

5 **[0041]** Para completar pXAG - 16 , que tiene la secuencia de codificación de péptido señal de hGH de 26 aminoácidos y el primer intrón del gen de la hGH; se retira primero un fragmento de EcoRI-BamHI de 2,0 kb de pXAG - 13. Este fragmento incluye el ADNc de α -gal A y los 3 'de hGH UTS. Este fragmento grande fue reemplazado con 3 fragmentos. El primer fragmento consistía en un producto de 0,3 kb de PCR de pXGH5 , que contiene la secuencia de codificación del péptido señal de hGH e incluye la primera secuencia de intrón de hGH, desde un sitio BamHI sintético situado justo secuencia arriba de la secuencia de consenso de Kozak en el extremo de la secuencia de codificación del péptido señal de hGH. Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron para amplificar este fragmento (Fragmento 1) : 5'-TTTTGGATCCACCATGGCTA-3 ' (Oligo HGH101 ; SEQ ID NO : 5) y 5'-TTTTGCCGGCACTGCCCTCTTGAA-3 ' (Oligo HGH102 ; SEQ ID NO : 6) . El segundo fragmento consistía en un producto de PCR de 0,27 kb que contiene secuencias correspondientes al inicio del ADNc que codifica la enzima de α -gal A de aminoácido 398 (es decir , que carecen del péptido señal de α -gal A) hasta el sitio NheI . Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron para amplificar este fragmento (Fragmento 2) : 5'-TTTTCAGCTGGACAATGGATTGGC-3 ' (Oligo AG10 ; SEQ ID NO : 7) y 5'-TTTTGCTAGCTGGCGAATCC-3 ' (Oligo AG11 ; SEC ID N °: 8) . El tercer fragmento consistía en el fragmento NheI - EcoRI de pXAG - 7 que contiene el resto de la secuencia de α -gal A así como las 3 'de hGH UTS (Fragmento 3) .

20 **[0042]** El fragmento 1 (digerido con BamHI y NaeI) , el fragmento 2 (digerido con PvuII y NheI) , y el fragmento 3 se mezclaron con el fragmento de 6,5 kb BamHI - EcoRI de pXAG - 13 que contiene el gen neo y el promotor IE de CMV y se ligaron juntos para generar el plásmido pXAG - 16 (Figura 4) .

B. Construcción de α -gal A

25 Plásmido Expresión pXAG – 28

30 **[0043]** El promotor $\alpha 2$ de colágeno humano se aisló para uso en la construcción de expresión pXAG - 28 de α -gal A de la siguiente manera . Se aisló un fragmento de PCR de 408 pb de ADN genómico humano que contiene parte del promotor $\alpha 2$ de colágeno humano utilizando los siguientes oligonucleótidos :

5'-TTTTGGATCCGTGTCCCATAGTGTTCCTCAA-3 ' (Oligo 72 ; SEQ ID NO : 9) y 5'-TTTTGGATCCGCAGTCGTGGCCAGTACC-3 ' (Oligo 73 ; SEQ ID NO : 10) .

35 **[0044]** Este fragmento se utilizó para seleccionar una biblioteca de leucocitos humanos en EMBL3 (Clontech Inc. , Palo Alto, CA) . Se aisló un clon positivo (fago 7H) que contenía un fragmento EcoRI de 3,8 kb y se clonó en pBSIISK + (Stratagene Inc. ,La Jolla, CA) en el sitio EcoRI (creando pBS/7H.2) . Un sitio AvrII fue introducido en pBSIISK + digiriendo con SpeI, que escinde dentro del poliligador pBSIISK + , " llenando " con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I y la inserción del oligonucleótido 5'-CTAGTCCTAGGA-3 ' (SEQ ID NO : 11). Esta variante de pBSIISK + se digirió con BamHI y AvrII y se ligó al fragmento de 121 pb BamHI - AvrII del fragmento PCR del promotor $\alpha 2$ de colágeno de 408 pb original que se describe arriba , creando pBS/121COL.6 .

45 **[0045]** El pBS/121COL.6 plásmido se digirió con XbaI , que escinde dentro de la secuencia de polienlazador pBSIISK + , "llenado" con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I , y se digirió con AvrII . El fragmento BamHI - AvrII de 3,8 kb de pBS/7H.2 se aisló y el sitio BamHI se hizo de extremos romos por tratamiento con la enzima de Klenow . El fragmento fue a continuación digerido con AvrII y se ligó al vector digerido con AvrII, creando así el plásmido de promotor del colágeno PBS/121bpCOL7H.18 .

50 **[0046]** A continuación, el promotor de colágeno se fusionó a los 5 ' UTS del gen de la β - actina humana , que contiene el primer intrón pf del gen de β - actina humana . Para aislar esta secuencia , un fragmento de PCR de 2 kb se aisló a partir de ADN genómico humano utilizando los siguientes oligonucleótidos :

55 5'-TTTTGAGCACAGAGCCTCGCCT-3 ' (Oligo BA1 ; SEQ ID NO : 12) y 5' – TTTTGGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCC - 3 ' (Oligo BA2 ; la SEQ ID NO : 13) .

60 **[0047]** Este fragmento se digirió con BamHI y BsiHKAI para liberar un fragmento de 0,8 kb que contiene el β - actina 5 ' UTS e intrón . A continuación, un fragmento Sall - SrfI de 3,6 kb se aisló a partir del plásmido pBS/121bpCOL7H.18 promotor de colágeno como sigue. pBS/121bpCOL7H.18 se digirió parcialmente con BamHI (el sitio BamHI se encuentra en el extremo 5 ' fragmento del promotor de colágeno $\alpha 2$) , hecho de extremos romos por tratamiento con el fragmento Klenow y ligado a un enlazador Sall (5'-GGTCGACC-3 ') , colocando así un sitio Sall de secuencia arriba del promotor de colágeno $\alpha 2$. Este plásmido se digirió con Sall y SrfI (el sitio SrfI se encuentra a 110 pb secuencia arriba del sitio CAP del promotor de colágeno $\alpha 2$) y el fragmento de 3,6 kb se aisló. Los fragmentos de 0,8 y 3,6 kb se combinaron con Sall - y BamHI - pBSIISK digerido - (Stratagene Inc. , La Jolla, CA) y un fragmento compuesto por los siguientes cuatro oligonucleótidos recididos juntos (que forman un fragmento con un extremo romo y un extremo BsiHKAI) :

5' -GGGCCCCAGCCCCAGCCCTCCCATTTGGTGGAGGCCCTTTTGGAGGCACCCTAG
GGCCAGGAAACTTTTGCCGTAT-3' (Oligo COL-1; SEQ ID NO:14),

5' -AAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTTAGCACCACGGCCGCGAGAC
CGCGTCCGCCCGCGAGCA-3' (Oligo COL-2; SEQ ID NO:15),

5' -TGCCCTATTTATACGGCAAAAGTTTCCTGGCCCTAGGGTGCCTCCAAAAGGGC
CTCCACCAATGGGAGGGCTGGGGCTGGGGGCC-3' (Oligo COL-3;
SEQ ID NO:16), and 5' -CGCGGGGCGGACGCGGTCTCGGCGGCCGTGGTGCT
AAAATAATAAGCCCGGATC-3' (Oligo COL-4; SEQ ID NO:17).

Estos cuatro oligonucleótidos, cuando se hibridan, se corresponden con la región que comienza en el sitio SrfI del promotor del colágeno y continúan a través del sitio BsiHKAI del promotor de β -actina. El plásmido resultante se denominó PCOL / β -actina.

[0048] Para completar la construcción de pXAG -28, el fragmento Sall- BamHI de PCOL / β -actina, que contiene el colágeno Promotor $\alpha 2$ y β -actina 5' UTS, se aisló. Este fragmento se ligó a dos fragmentos de pXAG -16 (véase el Ejemplo 1A y la Fig. 4): (1) el fragmento BamHI de 6,0 kb (que contiene el gen neo, columna vertebral del plásmido, el ADNc que codifica la enzima de α -gal A del ácido amino 398 y los 3' de hGH UTS), y (2) el fragmento BamHI -XhoI de 0,3 kb (que contiene la secuencia poli A SV40 de pcDNEO). pXAG -28 contiene el promotor de colágeno $\alpha 2$ humano fusionado a la β -actina humana 5' UTS, el péptido señal de hGH (que está interrumpido por el primer intrón de hGH), el ADNc que codifica la enzima de α -gal A y 3' de hGH UTS. Un mapa de la construcción pXAG -28 de la expresión completada se muestra en la Figura. 5.

C. Transfección y selección de fibroblastos electroporados con plásmidos de expresión α -gal A

[0049] Con el fin de expresar α -gal A en fibroblastos, fibroblastos secundarios fueron cultivados y transfectados según procedimientos publicados (Selden et al., WO 93 / 09222).

[0050] Los plásmidos pXAG -13, pXAG -16 y pXAG -28 fueron transfectados por electroporación en fibroblastos de prepucio humano para generar cepas de células clonales transfectadas de manera estable y los niveles resultantes de expresión de α -gal A fueron controlados como se describe en el Ejemplo ID. La secreción de α -gal A por fibroblastos de prepucio normales está en el intervalo de 2-10 unidades/células 10^6 / 24 horas. En contraste, los fibroblastos transfectados mostraron niveles de expresión medios tal como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1: Niveles de expresión de α -gal A Medio (desviación estándar +/-)

pXAG -13:	420 +/- 344 U/ 10^6 células / día N = 26 cepas clonales (rango 3 -1133 U/ 10^6 células / día)
pXAG -16:	2.051 +/- 1.253 U/ 10^6 células / día N = 24 cepas clonales (rango 422 -5.200 U/ 10^6 células / día)
pXAG -28:	141 +/- 131 U/ 10^6 células / día N = 38 cepas clonales (rango 20 -616 U/ 10^6 células / día)

[0051] Estos datos muestran que los tres constructos de expresión son capaces de incrementar la expresión de α -gal A muchas veces más que la de fibroblastos no transfectados. La expresión por fibroblastos transfectados de manera estable con pXAG -13, que codifica α -gal A vinculado al péptido señal α -gal A, fue sustancialmente inferior a la expresión por fibroblastos transfectados con pXAG -16, que difiere sólo en que el péptido señal es el péptido señal de hGH, la secuencia de codificación de los cuales es interrumpida por el primer intrón del gen de hGH.

[0052] Cada vez que las células transfectadas se sometieron a pases, la actividad secretada de α -gal A fue determinada, las células fueron contadas y se calculó la densidad celular. Con base en el número de células recolectadas y el tiempo permitido para la secreción de α -gal A, el rango de expresión específico de α -gal A se determinó y se presenta en las tablas 2 y 3 como unidades secretadas (de α -gal A) por 10^6 células por un período de 24 horas. Cepas celulares deseables para la terapia génica o para su uso en la generación de material para la purificación de α -gal A debe mostrar crecimiento y expresión estables durante varios pases. Los datos de las cepas

celulares que se muestran en las Tablas 2 y 3, que fueron transfectadas establemente con la construcción de expresión pXAG – 16 de α -gal A, ilustran el hecho de que la expresión de α -gal A se mantiene de forma estable durante el pase en serie.

5 Tabla 2 : Crecimiento y Expresión de células BRS- 11 que contienen la Construcción de Expresión pXAG -16 de α -gal A.

BRS- 11		
Pase	Expresión (unidades/10 ⁶ células/24hr)	Densidad celular (células/cm ²)
13	2601	4.80 x 10 ⁴
14	1616	4.40 x 10 ⁴
15	3595	4.40 x 10 ⁴

20 Tabla 3 : Crecimiento y Expresión de células HF503-242 que contienen la Construcción de Expresión pXAG -16 de α -gal A.

HF503 - 242		
Pase	Expresión (unidades/10 ⁶ células/24hr)	Densidad celular (células/cm ²)
5	4069	2.80 x 10 ⁴
6	7585	3.55 x 10 ⁴
7	5034	2.48 x 10 ⁴

35 D. Cuantificación de Expresión de α -gal A

40 **[0053]** La actividad de la actividad de α -gal A se midió usando el sustrato soluble en agua 4 - metilumbeliferil – α -D-galactopiranosido (4 -MUF -gal ; Research Products , Inc.) mediante una modificación del protocolo descrito por Ioannou et al . (J. Cell. 119:1137-1150 , 1992) . El sustrato se disolvió en tampón de sustrato (0,1 M de citrato - fosfato , de pH 4,6) a una concentración de 1,69 mg / ml (5 mM) . Como de costumbre, se añadieron 10 ml de sobrenadante de cultivo a 75 ml de la solución de sustrato . Los tubos se cubrieron y se dejaron incubar en un baño de agua a 37°C durante 60 minutos . Al final de el período de incubación , se usaron 2 ml de tampón glicina - carbonato (glicina 130 mM , carbonato sódico 83 mM , a 10,6 pH) , para detener la reacción . La fluorescencia relativa de cada muestra se midió usando un fluorómetro modelo TK0100 (Hoefer Scientific Instruments) , que tiene una longitud de onda de excitación fija de 365 nm y detecta una longitud de onda de emisión fija de 460 nm . Las lecturas de las muestras se compararon con patrones preparados a partir de 1 mM madre de metilumbeliferona (Sigma Chemical Co.) y la cantidad de sustrato hidrolizado se calculó. La actividad de α -gal A se expresa en unidades; una unidad de actividad α -gal A es equivalente a un nanomol de sustrato hidrolizado por hora a 37°C. Los datos de la expresión de la célula se expresan generalmente como unidades de actividad α -gal A secretada/10⁶ células/24hr. Este ensayo también se utilizó para medir la cantidad de actividad de α -gal A en lisados celulares y en muestras de diversas etapas de purificación de α -gal A, como se expone a continuación.

55 Ejemplo II . La purificación de α -gal A a partir del medio acondicionado de cepas de células Humanas transfectadas de manera estable

[0054] Los ejemplos IIA -IIE ilustran que α -gal A puede ser purificado hasta casi la homogeneidad del medio de acondicionado de cepas de células humanas cultivadas que han sido transfectadas de manera estable para producir la enzima.

60 A. Uso de Cromatografía Butilo Sepharose ® como un primer paso en la purificación de α -gal A

65 **[0055]** Medio condicionado frío (1,34 litros) se clarificó por centrifugación y se filtró a través de un filtro acetato de celulosa de 0,45 mm usando prefiltros de fibra de vidrio . Mientras se agitaba , el pH del medio filtrado frío se ajustó a 5,6 por la adición gota a gota de 1 N HCl y se añadió sulfato de amonio a una concentración final del 0,66 M por la adición gota a gota de una solución madre (temperatura ambiente) de 3,9 M de sulfato de amonio ultrapuro. El medio se agitó durante 5 minutos adicionales a 4°C , se filtró como antes y se aplicó a una columna de flujo rápido 4

de Butilo Sepharose® (volumen de columna 81 ml, 2,5 x 16,5 cm; Pharmacia, Uppsala, Suecia) que se había equilibrado en 10 mM de MES - Tris, pH 5,6, que contenía 0,66 M de Sulfato de amonio (tampón A). La cromatografía se realizó a 4 ° C en un sistema Gradi - Frac™ (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equipado con UV en línea (280 nm) y monitores de conductividad para la evaluación de proteína total y concentración de sal, respectivamente. Después de la aplicación de la muestra a una velocidad de flujo de 10 ml / min., la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón A. El α-gal A se eluyó de la columna Butilo Sepharose® con un gradiente lineal de 14 volúmenes de columna desde tampón A (que contiene sulfato de amonio) a 10 mM de MES - Tris, pH 5,6 (sin sulfato de amonio). Las fracciones se ensayaron para actividad α-gal A mediante el ensayo de 4 - MUF - gal y las que contenían actividad enzimática apreciable fueron agrupadas. Como se ve en la Figura. 6 y en el resumen de purificación (Tabla 3), esta etapa elimina aproximadamente el 99 % de la proteína contaminante (muestra de precolumna = 8,14 g de proteína total, muestra de post- columna = 0,0638 g de proteína total).

Tabla 4 : Purificación de α-gal A partir del medio acondicionado de fibroblastos humanos transfectados de forma estable

Paso de purificación	Volumen (ml)	Actividad α-gal A (x 10 ⁶ unidades)	Proteína total (mg)	Actividad específica (x 10 ⁶ unidades / mg)	Purificación del plegamiento (cumulativo)	Porcentaje de recuperación
Cultivo supernatant	1.340	14,6	8.140	0,0018	= 1	= 100
Butilo Sepharose®		14,1	63,8	0,221	123	96,6
Heparina Sepharose®	134	12,1	14,6	0,829	436	82,9
Hydroxyapatite	47	9,73	4,46	2,18	1.220	66,6
Q Sepharose®	31,5	8,91	3,31	2,69	1.503	61,0
superdex® 200	10	8,58	2,93	2,92	1.634	59,0

B. El uso de Cromatografía Heparina Sepharose® como un paso para la purificación de α-gal A

[0056] Las fracciones de los picos de columna de Butilo Sepharose® se dializaron a 4 ° C frente a (4 litros) de 10 mM de MES - Tris, pH 5,6 (un cambio). La conductividad del dializado se ajustó a 1,0 mMHO a 4°C mediante la adición de H₂O o NaCl según fue necesario. Después, la muestra se aplicó a una columna de Flujo rápido 6 de Heparina -Sepharose® (Pharmacia, Uppsala, Suecia; 29 ml de volumen de columna, 2,5 x 6 cm) que se había equilibrado en 10 mM de MES - Tris, pH 5,6, que contiene 9 mM de NaCl (tampón B). Esto se hizo a 4°C a una velocidad de flujo de 10 ml / min. UV en línea (280 nm) y monitores de conductividad midieron la proteína total y la concentración de sal. Después se aplicó la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón B seguido por un gradiente lineal de 3 volúmenes de columna de tampón de 8 % C/92 % de tampón B (donde el tampón C es de 10 mM MES-Tris, pH 5,6, que contiene NaCl 250 mM) y un lavado de 10 volúmenes de columna con tampón de 8 % C. Esto fue seguido por elución de α-gal A con un gradiente lineal de 1,5 volúmenes de columna a 29 % de tampón C y un gradiente de 10 volúmenes de columna lineal subsiguiente a 35% de tampón C. Las fracciones se analizaron para actividad α-gal A y las que contenían una actividad apreciable se agruparon.

C. Uso de cromatografía de hidroxiapatita como un paso para la purificación de α-gal A.

[0057] El grupo de heparina se filtró y se aplicó directamente a una columna de hidroxiapatita cerámica HC (40 mm; Americana International Chemical, Natick, MA; 12 ml. volúmenes de columna, 1,5 x 6,8 cm) que se había equilibrado en 1 mM de sodio fosfato, pH 6,0 (tampón D). La cromatografía se realizó a temperatura ambiente en un Sistema híbrido Gradi - Frac™ / FPLC® (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equipado con UV en línea (280 nm) y monitores de conductividad. Después que se aplicó la muestra (5 ml / min.), la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón D. El α-gal A se eluyó con un gradiente de volumen de columna de 7 lineal a 42 % de tampón E/58 % de tampón D (en donde el tampón E es 250 mM de fosfato de sodio, pH 6,0) seguido de un gradiente de volumen de columna de 10 a 52 % de tampón E. Las fracciones se analizaron para actividad α-gal A y las fracciones que contenían una actividad apreciable se agruparon.

D. Uso de cromatografía de intercambio de aniones O Sepharose® como una etapa para la purificación de α -gal A

5 [0058] El grupo de hidroxiapatita se diluyó aproximadamente 1,5 veces con H₂O a una conductividad final de 03.04 a 03.06 mMHO a temperatura ambiente . Después del filtrado , la muestra se aplicó a una columna de Q Sepharose® HP (Pharmacia , Uppsala , Suecia , volumen de columna 5,1 ml, 1,5 x 2,9 cm) equilibrada con 10 % de tampón G/90 % de tampón F, donde el tampón F es 25 M de sodio fosfato, pH 6,0 y el tampón G es 25 mM de fosfato de sodio, pH 6,0 , NaCl 250 mM . Se realizó la cromatografía a temperatura ambiente en el sistema híbrido Gradi - Frac™ / FPLC® (Pharmacia , Uppsala , Suecia) y fueron controladas la proteína total y las concentraciones de sal por los monitores en línea. La muestra se aplicó a una velocidad de flujo de 5 ml / min., a continuación se llevaron a cabo los pasos siguientes : (1) un lavado de 5 volúmenes de columna de búfer 10 % G, (2) un lavado de 7 volúmenes de columna a 12% de tampón G, (3) un gradiente lineal de 3 volúmenes de columna de tampón de 50 % G, (4) un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna de tampón de 53 %

10

15 G, (5) un gradiente de 3 volúmenes de columna al 100 % de tampón G, y (6) un lavado de 10 volúmenes de columna al 100 % de tampón G. El α -gal A se eluyó principalmente durante las etapas 3 y 4 . Las fracciones que contenían actividad apreciable se agruparon (el " grupo Q ") .

E. Uso de Cromatografía de filtración de Gel Superdex® -200 como un paso para la purificación de α -gal A

20 [0059] El grupo Q se concentró aproximadamente 5 veces utilizando unidades concentradoras centrífugas Centriprep® -10 (Amicon , Beverly, MA) y se aplicó a una columna de Superdex® 200 (Pharmacia , Uppsala, Suecia ; 189 ml de volumen de columna , 1,6 x 94 cm) . La columna se equilibró y se eluyó con 25 mM de fosfato de sodio, pH 6,0 , que contiene 150 mM de NaCl . La cromatografía se realizó en un sistema de FPLC® (Pharmacia , Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente usando un monitor de UV en línea (280 nm) para seguir la elución de la proteína. El volumen de la muestra aplicada a la columna era \leq 2 ml, la tasa de flujo fue de 0,5 ml / min. , y el tamaño de la fracción era 2 ml . Se realizaron múltiples usos de columna ; se ensayaron fracciones para actividad α -gal A al y se agruparon las fracciones que contenían actividad apreciable.

25

30 [0060] Las fracciones agrupadas procedentes de la columna Superdex® 200 se concentraron utilizando unidades Centriprep - 10, se dividieron en alícuotas , se congelaron y se almacenaron a -80 ° C durante períodos cortos de tiempo . Un resumen de este ejemplo de purificación α -gal A se muestra en la Tabla 3 . El rendimiento final de α -gal A era de un 59 % de la actividad material de partida y la actividad específica de producto purificado era $2,92 \times 10^6$ unidades / mg de proteína. El producto resultante mostró un alto nivel de pureza después de la electroforesis bajo condiciones reductoras en un 4-15% de gel de poliacrilamida SDS que posteriormente fue teñido con plata.

35

Ejemplo III . Formulación y Almacenamiento de α -gal A purificado

40 [0061] El α -gal A altamente purificado no es estable durante largos períodos de tiempo cuando se almacena como una solución diluida de proteína purificada (\leq 1 mg de proteína / ml) . Por lo tanto , una formulación se diseñó para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento prolongado , es decir el almacenamiento de varias semanas hasta al menos varios meses. La enzima purificada se concentró hasta al menos 1 mg / ml usando un concentrador de centrífuga (en tampón de la enzima que consta de 25 mM de fosfato de sodio (pH 6,0) y 150 mM de NaCl) . Albúmina de suero humano (HSA ; buminato® , Baxter - Hyland) se añadió a una concentración final de 2,5 mg / ml . La solución de proteína fue entonces filtrada estérilmente usando un filtro de acetato de celulosa de 0,2 mm (Schleicher y Schuell) unido a una jeringa .

45

La solución de α -gal A se dispensó en viales estériles de vidrio, libres de pirógenos, sellados con una tapa de teflón , congelado en segundos y almacenado a -20 ° C.

50 [0062] La estabilidad de la actividad de α -gal A se evaluó durante un período de tres meses utilizando el ensayo 4 - MUF -gal. Los datos presentados en la Tabla 5 demuestran que no hubo pérdida de la actividad enzimática durante el periodo de prueba. El pH ácido de la formulación ($< 6,5$) es crítico para la estabilidad de la enzima altamente purificada .

55

Tabla 5 : Estabilidad de α -gal A Formulado a -20°C

Muestra	Actividad específica (unidades / mg de proteína total)
tiempo 0	$2,24 \times 10^6 + / -0,33 \times 10^6$
semana 1	$2,40 \times 10^6 + / -0,25 \times 10^6$
semana 2	$2,42 \times 10^6 + / -0,21 \times 10^6$
semana 3	$2,37 \times 10^6 + / -0,05 \times 10^6$
mes 1	$2,39 \times 10^6 + / -0,16 \times 10^6$
mes 2	$2,31 \times 10^6 + / -0,26 \times 10^6$
mes 3	$2,29 \times 10^6 + / -0,17 \times 10^6$

Ejemplo IV . El α -gal A producido por cepas de células humanas es adecuado para el tratamiento de deficiencia de α -gal A

[0063] Las propiedades estructurales y funcionales de α -gal A humano purificado preparado de acuerdo con la invención se ha investigado con el fin de demostrar que las moléculas de ADN descritas en este documento y las correspondientes glicoproteínas expresadas producidas por cepas de células humanas transfectadas se pueden utilizar en el gen o en terapias de reemplazo de enzimas, respectivamente .

A. Tamaño de α -gal A producido por células Humanas transfectadas de manera estable en Cultura

[0064] La masa molecular de α -gal A se estimó por espectrometría de masas MALDI - TOP . Estos resultados demuestran que la masa molecular del dímero es 102.353 Da , mientras que la del monómero es de 51.002 Da . La masa molecular esperada del monómero , basada en la composición de aminoácidos , es de 45.400 Da . Por lo tanto, se puede inferir que el contenido de hidrato de carbono de la enzima representa hasta 5.600 Da del peso molecular.

[0065] Los resultados de análisis de aminoácidos estándar realizados en la proteína purificada son consistentes con la conclusión de que la proteína producida por las células humanas transfectadas es idéntica a la proteína purificada a partir de tejidos humanos en el nivel de amino ácido .

B. Procesamiento de N-terminal de α -gal A producido por células Humanas transfectadas de manera estable

[0066] La secuencia de nucleótidos de ADNc de α -gal A humano codifica 429 aminoácidos. Los 31 aminoácidos N-terminales constituyen una secuencia de péptido señal, que se escinde cuando la proteína naciente transita la membrana del retículo endoplásmico (LeDonne et al, Arch. Biochem Biophys 224:186 , 1983 ; Lemansky et al , J. Biol. Chem. 262:2062 , 1987 . .) . Para confirmar que el α -gal A se procesa correctamente cuando se asocia con una secuencia de péptido señal heteróloga (por ejemplo , la secuencia señal de la hormona de crecimiento humana) y se expresa en fibroblastos humanos transfectados , diez aminoácidos N-terminal de la proteína secretada fueron microsecuenciados. Las muestras se sometieron a electroforesis por SDS - PAGE y transferidos a ProBlott® (ABI , Foster City , CA) usando un CAPS de 10 mM (pH 11,0) , sistema tampón de 10 % de metanol. La proteína en la ProBlott® se visualizó mediante tinción de Coomassie y se escindió una banda de tamaño apropiado (50 kDa) . La secuencia de N-terminal se obtuvo usando un secuenciador de amino ácido de fase pulso líquido de Applied Biosystems que realiza degradación de Edman automatizada. La secuencia N - terminal obtenida, LDNGLARTPT (SEQ ID NO : 28) , es consistente con la adecuada escisión del péptido señal y coincide con la secuencia de N - terminal predicha para la proteína secretada .

C. Aminoácido C-terminal para α -gal A producido por células Humanas transfectadas de manera estable

[0067] Se identificó el residuo de aminoácido C-terminal de α -gal A secretado producido de acuerdo con la invención utilizando un secuenciador C-terminal automatizado de Hewlett Packard . Los resultados indicaron un residuo de leucina en el C -terminus que está de acuerdo con el aminoácido C-terminal predicho por la secuencia de ADN .

D. Modificación de Carbohidratos de α -gal A producida por células Humanas transfectadas de manera estable

[0068] También se evaluó el patrón de glicosilación de α -gal A producido de acuerdo con la invención . Una correcta glicosilación es importante para la óptima actividad in vivo de α -gal A; α -gal A expresado en sistemas no glicosilantes

es inactivo o inestable (Hantzopolous y col . , Gene 57:159 , 1987) . La glicosilación también es importante para la internalización de α -gal A en las células objetivo deseadas y afecta a la semivida en circulación de la enzima in vivo . En cada subunidad de α -gal A hay cuatro sitios disponibles para la adición de cadenas de carbohidratos ligados a asparagina , de los cuales sólo tres están ocupados (Desnick et al . , en las bases metabólicas y moleculares de la enfermedad hereditaria , pp 2741-2780 , McGraw Hill, Nueva York, 1995) .

[0069] Una muestra de α -gal A producida por células transfectadas de forma estable se trató con neuraminidasa , que es aislada de *A. urafaciens* , (Boehringer - Mannheim , Indianapolis, IN) para eliminar el ácido siálico . Esta reacción se lleva a cabo por el tratamiento de 5 mg de α -gal A durante una noche con 10 mU de neuraminidasa a temperatura ambiente en un volumen total de 10 ml de solución salina tamponada de acetato (ABS , 20 mM de acetato de sodio, pH . 5,2 , 150 mM de NaCl) .

[0070] También se desfosforiló α -gal A purificado producido por células transfectadas de forma estable usando fosfatasa alcalina (fosfatasa alcalina intestinal de ternero , Boehringer - Mannheim , Indianapolis, IN) , tratando 5 mg de α -gal A durante una noche a temperatura ambiente con 15 U de fosfatasa alcalina en ABS (el pH se elevó a 7,5 con 1 M Tris) .

[0071] Las muestras se analizaron por Western blot con un anticuerpo α -gal A específico. El anticuerpo utilizado fue un anti - péptido policlonal de conejo, que fue producido usando un péptido que representa los aminoácidos 68-81 de α -gal A como un inmunógeno. Después de la transferencia de la proteína a PVDF (Millipore, Bedford , MA) , la membrana se sondeó con una dilución 1 :2000 del antisuero en 2,5 % de Blotto (leche seca sin grasa en 20mM de Tris - HCl , pH 7,5 , 0,05 % de Tween - 20) . Esto fue seguido por la detección con IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Organon Teknika / Cappel , Durham ,NC ; dilución 1:5000) y reactivos del kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham, Arlington Heights , IL) .

[0072] El tratamiento de α -gal A con neuraminidasa resulta en un ligero cambio en la masa molecular (aproximadamente 1.500 a 2.000 Da o 4-6 siálico ácidos / monómero) , lo que sugiere que existe una amplia modificación de α -gal A con ácido siálico . Para referencia , la forma de plasma de α -gal A tiene 5-6 residuos de ácido siálico por monómero , y la forma placentaria tiene 0,5-1,0 residuos de ácido siálico por monómero (Bishop et al . , J. Biol. . Chem. 256:1307 , 1981) .

[0073] Otro método usado para examinar las modificaciones de ácido siálico y manosa - 6 - fosfato de α -gal A era el enfoque isoelectrónico (IEF) , donde las muestras se separan sobre la base de su punto isoelectrónico (pI) o carga neta . Por lo tanto , se esperaba que la eliminación del α -gal A de residuos cargados tales como ácido siálico o fosfato alterarían la movilidad de la proteína en el sistema IEF .

[0074] Para realizar el experimento IEF , muestras de α -gal A producido de acuerdo con la invención fueron tratadas con neuraminidasa y fosfatasa alcalina , mezcladas 1:1 con tampón de muestra 2X Novex (con 8 M de urea, pH 3,0-7,0) , y se cargó en 6 M de gel IEF de urea (5,5 % de poliácridamida) hecho usando Pharmalyte ® (Pharmacia , Uppsala, Suecia ; pH 3,0-6,5 ; Pharmalyte ® 4-6.5 y 2.5 a 5.5 , 0.25 ml cada uno por gel) . También se incluyeron estándares punto isoelectrónico (Bio-Rad) . Después de la electroforesis , el gel se transfirió a PVDF y se realizaron análisis de transferencia Western como se describe anteriormente .

[0075] El α -gal A producido por los fibroblastos humanos transfectados de forma estable consistía en tres principales isoformas con un rango de pI de aproximadamente 4,4 a 4,65 . Estos valores son similares a los inhibidores de proteasa del plasma y a formas esplénicas de α -gal A (Bishop et al . , J. Biol. . Chem. 256:1307 , 1981) . El tratamiento con neuraminidasa de la enzima aumentó el pI de las tres isoformas , lo que indica que todas se modificaron en cierto grado por el ácido siálico . Estos datos sugieren que el α -gal A producido por células humanas transfectadas de forma estable deben tener media vida en plasma deseable , lo que indica que este material es muy adecuado para el uso farmacológico . Además, el tratamiento de α -gal A tratado con neuraminidasa con fosfatasa alcalina aumenta aún más el pI de una parte de la proteína a aproximadamente 5,0-5,1 , lo que indica que la enzima lleva uno o más residuos de manosa - 6 - fosfato . Esta modificación es significativa porque es necesaria para la internalización eficaz de α -gal A por las células objetivo .

E. Actividad Específica de α -gal A purificado a partir de fibroblastos transfectados de forma estable

[0076] La potencia o la actividad específica de α -gal A purificado se calcula midiendo la actividad catalítica de la enzima (con el ensayo de 4 - MUF - gal) y la concentración de proteína . La concentración de proteína se puede determinar por cualquier método estándar , tales como con el sistema BCA (Pierce) , o mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y usando el mg / ml de coeficiente de extinción de 2,3 (determinado a partir de análisis de aminoácidos) para calcular el valor . Usando estas técnicas , la actividad específica de α -gal A purificado del medio condicionado de fibroblastos humanos transfectados es 2.2 a 2.9 x 10⁶ unidades / mg de proteína, que es comparable a la actividad específica de α -gal A que se purifica a partir de tejidos humanos (Bishop et al . , J. Biol. . Chem. 256:1301 , 1981) .

F. - Manosa o manosa - 6 - Fosfato mediado por la internalización de α -gal A

[0077] A fin de que el α -gal producido por células transfectadas de forma estable sea un agente terapéutico eficaz para deficiencias de α -gal A, la enzima debe ser internalizada por las células afectadas . El α -gal A no es activo a niveles de pH fisiológicos , y es poco probable que sea eficaz en la sangre o fluidos intersticiales . Solo metaboliza sustratos lípidos acumulados de forma óptima cuando es internalizado en el medio ácido del lisosoma . Esta internalización está mediada por la unión de α -gal A a receptores manosa - 6 - fosfato (M6P), que se expresan en la superficie celular y liberan la enzima al lisosoma a través de la vía endocítica . El receptor de M6P es ubicuamente expresado; la mayoría de las células somáticas lo expresan en cierta medida . El receptor de manosa , que es específico para residuos de manosa expuestos sobre glicoproteínas , es menos prevalente . Estos últimos receptores se encuentran generalmente sólo en las células macrófagas y de apariencia macrófaga y proporcionan un medio adicional de entrada de α -gal A en estos tipos de células .

[0078] Con el fin de demostrar la internalización mediada por M6P de α -gal A , fibroblastos de la piel de un paciente con la enfermedad de Fabry (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository) se cultivaron durante la noche en presencia de concentraciones crecientes de α -gal A purificado de la invención . Algunas de las muestras contenían 5 mM de M6P soluble, que inhibe de forma competitiva la unión a y como resultado, la internalización por el receptor de fosfato de manosa - 6 . Otras muestras contenían 30 mg / ml manano , que inhibe la unión a y como resultado , la internalización por el receptor de manosa . Después de la incubación, las células se lavaron y se recogieron por raspado en tampón de lisis (10 mM Tris, pH 7,2 , 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM Pefabloc TM (Boehringer - Mannheim, Indianapolis, IN) y 1 % de NP - 40) . Las muestras lisadas se analizaron para detectar la concentración de proteína y la actividad de α -gal A. Los resultados se expresan como unidades de proteína de la célula, actividad / mg de α -gal A. Las células de Fabry internalizaron α -gal A de una manera dependiente de la dosis (Fig. 7) . Esta internalización se inhibió por manosa - 6 fosfato pero no hubo inhibición con manano. Por lo tanto, la internalización de α -gal A en fibroblastos de Fabry está mediada por el receptor de manosa - 6 fosfato, pero no por el receptor de manosa.

[0079] El α -gal A también es internalizado in vitro por células endoteliales , células objetivo importantes para el tratamiento de la enfermedad de Fabry . Células endoteliales de vena umbilical humanas (HUVECs) se cultivaron durante la noche con 7.500 unidades de α -gal A, algunos de los pocillos contenían M6P . Después del período de incubación, las células se recogieron y se analizaron en cuanto a α -gal A como se describió anteriormente. Las células incubadas con α -gal A sólo tenían niveles enzimáticos casi 10 veces por encima de las células del control (sin incubación con α -gal A) . El M6P inhibió la acumulación intracelular de α -gal A , lo que sugiere que la internalización de α -gal A por HUVEC está mediada por el receptor de M6P . Por lo tanto , el α -gal A humano de la invención se internaliza por las células clínicamente pertinentes .

[0080] Pocas líneas celulares humanas cultivadas son conocidas por expresar el receptor de manosa . Sin embargo, una línea celular semejante a ratón macrófago (J774.E) que lleva receptores de manosa pero pocos o ninguno de los receptores manosa-6 fosfato pueden ser utilizados para determinar si el α -gal A purificado de la invención se internaliza mediante el receptor de manosa (Diment y col . , J. Leukocyte Biol . 42:485-490 , 1987) . Las células J774.E se cultivaron durante la noche en presencia de 10.000 unidades / ml de α -gal A. Algunas muestras también contenían 2 mM M6P y otras contenían 100 mg / ml de manano . Las células se lavaron y se recogieron como se describe anteriormente y se determinó la proteína total y la actividad α -gal A de cada muestra . Los resultados se muestran en la Tabla 5 . El M6P no inhibe la captación de α -gal A por estas células , mientras que el manano disminuye los niveles de α -gal A acumulado por un 75 % . Por lo tanto, el α -gal A de la invención puede ser internalizado por el receptor de manosa en tipos celulares que expresen este receptor de superficie celular en particular .

Tabla 6 . Internalización de α -gal A por células J774.E .

Actividad α -gal A (unidades / mg de proteína total)					
	sin adiciones	+ α -gal A	+ α -gal A + M6P	+ α -gal A, + manano	
J774.E		409 ± 25	6.444 ± 554	6.297 ± 674	1.654 ± 323
[manano] = 100 mg / ml					
[M6P] = 2 mM o 660 mg / ml					

[0081] Estos experimentos demuestran que el α -gal A producido por células humanas transfectadas de forma estable puede ser internalizado por las células a través de manosa o receptor de manosa - 6 - fosfato .

G. Corrección de fibroblastos Fabry por fibroblastos humanos Expresando α -gal A

[0082] Para la terapia génica, un implante de células autólogas que producen α -gal A debe producir la enzima en una forma modificada apropiadamente para "corregir" la deficiencia de α -gal A en las células objetivo. Para evaluar el efecto de producción de α -gal A por fibroblastos humanos transfectados en células de Fabry, fibroblastos recogidas de pacientes con la enfermedad de Fabry (NIGMS Human Genetics Mutant Cell Repository) se co-cultivaron con una cepa de células productora de α -gal A (BRS - 11) en Transwells® (Costar, Cambridge, MA). El sistema experimental se muestra en la Figura 8. Células de Fabry fueron cultivadas en platos de cultivo de tejidos de 12 pocillos, algunos contenía insertos (Transwells®, 0,4 mm de tamaño de poro) que tienen una superficie sobre la que las células pueden ser cultivadas. El crecimiento matriz del inserto es poroso y permite que las macromoléculas pasen desde la parte superior a la inferior del medio. Un conjunto de inserciones contenía fibroblastos de prepucio humano normal (HF), que secretan niveles mínimos de α -gal A, mientras que otro conjunto contenía la cepa de fibroblastos humanos transfectados de forma estable, BRS - 11, que secreta grandes cantidades de α -gal A. En los pocillos co-cultivados con células productoras de α -gal A, el α -gal A puede entrar al medio que baña las células de Fabry y potencialmente ser internalizado por las células de Fabry.

[0083] Los datos de la Tabla 7 muestran que las células de Fabry internalizan el α -gal A secretado. Los niveles intracelulares de α -gal A fueron controlados durante tres días. Esas células cultivadas solas (sin inserto) o en presencia de fibroblastos de prepucio no transfectados (inserto HF) tenían muy bajos niveles intracelulares de actividad α -gal A. Las células cultivadas de Fabry con las células de productor de α -gal A (inserto BRS - 11) sin embargo, mostraron niveles de enzimas similares a los de las células normales al final del Día 2 (fibroblastos normales tienen de 25 a 80 unidades de proteína α -gal A /mg). Que la corrección se debe a α -gal A asumido a través del receptor de M6P se demuestra por su inhibición con manosa - 6 - fosfato (inserto BRS - 11 + M6P).

Tabla 7. Corrección de fibroblastos de Fabry por fibroblastos humanos Expresando α -gal A

Actividad α -gal A (proteína total unidades-mg)				
Tiempo	sin inserto	inserto REF	inserto BRS- 11	inserto BRS- 11 + M6P
Día	1 2 ± 1	2 ± 1	13 ± 1	4 ± 1
Día 2	2 ± 1	2 ± 1	40 ± 11	6 ± 2
Día 3	2 ± 1	5 ± 1	85 ± 1	9 ± 1

H. Utilidad de otros tipos de células

[0084] Otros tipos de células se pueden usar en el método descrito en el presente documento. Las células se pueden obtener de una variedad de tejidos e incluir todos los tipos de células que se pueden mantener en cultivo. Por ejemplo, células primarias y secundarias que pueden ser transfectadas por el presente método incluyen fibroblastos humanos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales de mama o intestinales), células endoteliales, células gliales, células neurales, elementos formados de la sangre (por ejemplo, linfocitos y células de la médula ósea), células musculares, y precursores de estos tipos de células somáticas. Los fibroblastos son de particular interés. Las células primarias se obtienen preferiblemente a partir de la persona a quien las células primarias o secundarias transfectadas se van a administrar, para que no sean rechazadas por el sistema inmune del paciente. Sin embargo, si se le da la debida atención para evitar o contener el inmuno rechazo (como se describe más adelante), las células de un donante humano distinto del paciente se pueden utilizar también. Esto permitiría el uso de las células de una línea celular transfectada de modo estable, establecida y estandarizada en todos los pacientes.

I. Formulación farmacéutica para la administración convencional de la Proteína de α -gal A

[0085] La proteína α -gal A que se expresa y se secreta por células humanas transfectadas de manera estable (o de otra manera modificadas genéticamente) y purificadas como se describe en el presente documento se pueden administrar a individuos que producen proteína α -gal A insuficiente o defectuosa. La proteína se puede administrar en un cargador farmacéuticamente aceptable, a un pH por debajo de 6,5, por ejemplo, en una formulación como se describe en el Ejemplo III. Los ejemplos de excipientes que pueden incluirse en la formulación son tampones tales como tampón citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato, y tampón bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas tales como albúmina de suero y gelatina, EDTA, cloruro de sodio, liposomas, polivinilpirrolidona, manitol, sorbitol, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG - 4000, PEG - 6000). La ruta de la administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intrapulmonar, o transmucosa. La vía de administración y la cantidad de proteína entregada se determinará por factores que están dentro de la capacidad de los artesanos expertos para evaluar. Por otra parte, los artesanos expertos son conscientes de que la vía de administración y la dosificación de una proteína terapéutica pueden variarse para un paciente dado hasta que un nivel de dosificación terapéutico sea

obtenido . Por lo general, se administrarán dosis de α -gal A de 0,01 a 100 mg / Kg. de peso corporal. Se espera que dosis repetidas regularmente de la proteína sean necesarias durante la vida del paciente .

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0086]

(1) INFORMACIÓN GENERAL :

10

(i) SOLICITANTE : Transkaryotic Therapies, Inc.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN : TERAPIA PARA LA DEFICIENCIA DE α -galactosidasa A

15

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS : 28

(iv) Dirección para la correspondencia :

(A) DESTINATARIOS : Fish & Richardson, P.C.

(B) CALLE: 225 Franklin Street

20

(C) CIUDAD: Boston (D) ESTADO : MA

(E) PAÍS: EE.UU.

(F) Código postal : 02110-2804

25

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR :

(A) TIPO MEDIO : Floppy disk

(B) ORDENADOR : IBM compatible con PC

(C) SISTEMA OPERATIVO : PC-DOS/MS-DOS

30

(D) SOFTWARE : PatentIn Release # 1.0 , Versión # 1.30

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL :

35

(A) NÚMERO DE SOLICITUD :

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN :

(C) CLASIFICACIÓN :

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA :

40

(A) NÚMERO DE SOLICITUD : 08 / 712, 614

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN : 13 -SEP- 1996

(C) CLASIFICACIÓN :

45

(viii) ABOGADO / AGENTE DE INFORMACIÓN :

(A) NOMBRE: Fraser, Janis K.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 34,819

(C) NÚMERO DE REFERENCIA / EXPEDIENTE : 07236/003WO1

50

(ix) INFORMACIÓN TELECOMUNICACIONES :

(A) TELÉFONO: 617/542-5070

(B) TELEFAX : 617/542-8906

(C) TELEX : 200154

55

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 1 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 1 :

CTGGGCTCTA GCTATGATAA AC 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 2 :

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 2 :
TCTAGCTGAA GCAAAACAGT G 21

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 3 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 pares de bases
- 20 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 3 :
ATTGGTCCGC CCCTGAGGT 19

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 4 :

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 4 :
TGATGCAGGA ATCTGGCTCT 20

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 5 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- 45 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 5 :
TTTTGGATCC ACCATGGCTA 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 6 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 6 :
TTTTGCCGGC ACTGCCCTCT TG .. 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 7 :

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 7 :
TTTTTCAGCTG GACAATGGAT TGGC 24
- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 8 :
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 8 :
TTTTTGCTAGC TGGCGAATCC 20
- 20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 9 :
- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA SEC ID N ° : 9 :
TTTTGGATCC GTGTCCCATA GTCTTTCCAA 30
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 10 :
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 40 (A) LONGITUD: 28 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 45 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 10 :
TTTTGGATCC GCAGTCGTGG CCACTACC 28
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 11 :
- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA :
- (A) LONGITUD: 12 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 11 :
CTAGTCCTAG GA 12
- 60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 11 :
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
- 65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 12 :
TTTTGAGCAC AGAGCCTCGC CT 22

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 13 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

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

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 13 :
TTTTGGATCC GGTGAGCTGC GAGAATAGCC 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 14 :

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 76 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 14 :

30 **GGGCCCCCAG CCCCAGCCCT CCCATTGGTG GAGGCCCTTT TGGAGGCACC CTAGGGCCAG 60**
GAAACTTTTG CCGTAT 76

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 15 :

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 76 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 15 :

45 **AAATAGGGCA GATCCGGGCT TTATTATTTT AGCACCACGG CCGCCGAGAC CGCGTCCGCC 60**
CCGCGAGCA 69

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 16 :

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 76 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 16 :

60 **TGCCCTATTT ATACGGCAAA AGTTTCCTGG CCCTAGGGTG CCTCCAAAAG GGCCTCCACC 60**
AATGGGAGGG CTGGGGCTGG GGGCCC 86

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 17 :

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 55 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 17 :
 CGCGGGGCGG ACGCGGTCTC GCCGGCCGTC GTGCTAAAAT AATAAAGCCC GGATC 55

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 18 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 76 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 18 :

20	CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC	60
	ATCTGGGCTG CGCGCTTGGC CTTCCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG	120
	CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC	180
25	GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTG CTGCATCAGT GAGAAGCTCT	240
	TCATGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC	300
	TCTGCATTGA TGACTGTTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTG AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG	360
30	ACCCTCAGCG CTTTCCTCAT GGGATTGCCC AGCTAGCTAA TTATGTTTAC AGCAAAGGAC	420
	TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA AAAAACTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT	480
	TTGGATACTA CGACATTGAT GCCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAAT	540
35	TTGATGGTTG TTAGTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGTTTATAAG CACATGTCCT	600
	TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT	660
	GGCCCTTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT	720
40	TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA	780
	ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG	840
	TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCTGGGCTA	900
45	TCATGGCTGC TCCTTTATTC ATGTCTAATG ACCTCCGACA CATCAGCCCT CAAGCCAAAG	960
	CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGGT	1020
50	ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT	1080
	GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATCGCAG	1140
	TTGCTTCCCT GGGTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTTATCACA CAGCTCCTCC	1200
55	CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGACTTCAAG GTTAAGAAGT CACATAAATC	1260
	CCACAGGCAC TGTTTTGCTT CAGCTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC	1320
	TTTAAAAAAA AAAAAAATC GAG	1343

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 19 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 210 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADENA: sencilla

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 19 :

5 **CTGGGCTGTA GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCGCTCTT ATACCATCGC 60**
AGTTGCTTCC CTGGGTAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT 120
CCCTGTGAAA AGGAAGCTAG GGTCTATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA 180
10 **TCCCACAGGC ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA 210**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 20 :

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 268 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 20 :

25 **ATTGGTCCGC CCCTGAGGTT AATCTTAAAA GCCCAGGTTA CCCGCGGAAA TTTATGCTGT 60**
CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC ATCTGGGCTG CCGGCTTGCG 120
CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG CTAGAGCACT GGACAATGGA 180
30 **TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC GCTTCATGTG CAACCTTGAC 240**
TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCA 268

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 21 :

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : péptido

45 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 21 :

50 **Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu 15**
1 5 10
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala 25
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 22 :

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 78 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 22 :

65 **ATGGCTACAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG 60**
CTTCAAGAGG GCAGTGCC 78

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N °: 23 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA lineal

10 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 23 :
TTTTGGATCC CTCGAGGACA TTGATTATTG ACTAG 35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N °: 24 :

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 24 :
TTTTGGATCC CGTGTCAAGG ACGGTGAC 28

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N °: 25 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 1197 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 25 :

	CTGGACAATG GATTGGCAAG GACGCCTACC ATGGGCTGGC TGCACCTGGGA GCGCTTCATG	60
	TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAGCT CTTTCATGGAG	120
5	ATGGCAGAGC TCATGGTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT	180
	GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAAGAGAT TCAGAAGGCA GACTTCAGGC AGACCCTCAG	240
	CGCTTTCCTC ATGGGATTCG CCAGCTAGCT AATTATGTTT ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA	300
10	GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCGCAGGCT TCCCTGGGAG TTTTGGATAC	360
	TACGACATTG ATGCCCAGAC CTTTGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGGT	420
15	TGTTACTGTG ACAGTTTGGG AAATTTGGCA GATGGTTATA AGCACATGTC CTTGGCCCTG	480
	AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGTACTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT	540
	CAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTGCTGAC	600
20	ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTTT TAACCAGGAG	660
	AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAAATGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC	720
	AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAGCAAGTA ACTCAGATGG CCCTCTGGGC TATCATGGCT	780
25	GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAGCCAA AGCTCTCCTT	840
	CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT	900
30	AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA	960
	GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCGCTCTT ATACCATCGC AGTTGCTTCC	1020
	CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA	1080
35	AGGAAGCTAG GGTTCATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC	1140
	ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAT TAAAAGACTT ACTTTAA	1197

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 26 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 398 aminoácidos
- (B) TIPO : aminoácido
- 45 (C) CADENA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : péptido

50 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 26 :

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

Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu
 145 150 155 160
 5 Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
 165 170 175
 Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
 180 185 190
 10 Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile
 195 200 205
 Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp
 210 215 220
 15 Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
 225 230 235 240
 Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp
 245 250 255
 20 Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile
 260 265 270
 Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
 275 280 285
 25 Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
 290 295 300
 30 Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val
 305 310 315 320
 Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
 325 330 335
 35 Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
 340 345 350
 Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
 355 360 365
 40 Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
 370 375 380
 45 Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 385 390 395

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N °: 27 :

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 338 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 27 :

60 ATGGCTACAG GTAAGCGCCC CTA AATCCC TTGGGCACA ATGTCTCCTG AGGGGAGAGG 60
 CAGCGACCTG TAGATGGGAC GGGGGCACTA ACCCTCAGGT TTGGGGCTTC TGAATGTGAG 120

65

TATCGCCATG TAAGCCCAGT ATTTGGCCAA TCTCAGAAAG CTCCTGGTCC CTGGAGGGAT 180
GGAGAGAGAA AAACAAACAG CTCCTGGAGC AGGGAGAGTG CTGGCCTCTT GCTCTCCGGC 240
5 TCCCTCTGTT GCCCTCTGGT TTCTCCCCAG GCTCCCCGGAC GTCCTGCTC CTGGCTTTTG 300
GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG CTTCAAGAGG GCAGTGCC 338

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N ° : 28 :

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD : 10 aminoácidos
 (B) TIPO : aminoácido
 (C) CADENA: no relevante
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : péptido

20 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO : 28 :

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1 . Un método de producción de α -Gal A humano purificado, que comprende (a) cultivar una célula humana por ingeniería genética modificada para sobreexpresar y secretar α -Gal A humano en un medio , (b) recoger el medio que comprende el α -Gal A humano a partir de dichas células cultivadas , y (c) purificar α -Gal A humano a partir del medio por (i) pasar el medio a través de una resina de interacción hidrófoba y eluyendo α -Gal A humano de la resina , y (ii) hacer pasar el α -Gal A humano eluido sobre columnas que contienen una resina de heparina inmovilizada, hidroxapatito , una resina de intercambio de aniones y una resina de exclusión de tamaño y eluyendo α -Gal A humano purificado de la columna final, donde el α -Gal A humano purificado este libre de agentes de afinidad de lectina proteica y agentes análogos de sustrato de α -Gal A.
- 10 2 . El método de la reivindicación 1 , en el que la célula ha sido transfectada con una molécula de ADN que codifica α -Gal A humano.
- 15 3 . El método de la reivindicación 1 , en el que la célula ha sido transfectada con una molécula de ADN que comprende un elemento regulador que controla la expresión de la secuencia codificante para el α -Gal A.
- 20 4 . El método de la reivindicación 1 , en donde la célula se modifica por la activación de genes para expresar α -Gal A.
- 5 . El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 , en el que la célula es de fibroblastos .
- 6 . El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 , en el que la célula es una célula primaria .
- 25 7 . El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 , en el que la célula es una célula secundaria .
- 8 . El método de la reivindicación 5 en el que el α -Gal A humano purificado tiene una actividad específica de $2,2 \cdot 10^6$ unidades / mg de proteína .
- 30 9 . El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes , en el que pasar el medio a través de una resina de interacción hidrófoba constituye el primer paso de cromatografía durante la purificación .
- 35 10 . El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes , en el que el resto funcional de la resina de interacción hidrófoba comprende un grupo butilo .
- 40 11 . Una composición farmacéutica que comprende una enzima de α -Gal A humano purificado glicosilada para su uso en terapia de reemplazo de la enzima en una deficiencia de α -Gal A, en el que dicha composición este libre de (i) agentes de afinidad a la lalectina proteinácea y (ii) agentes analógicos sustratos de α -Gal A .
- 45 12 . La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11 , en la que dicha enzima es modificada por la sialilación .
- 13 . La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11 o 12 , en la que dicha enzima contiene manosa-6 - fosfato en sus oligosacáridos ligados a N.
- 50 14 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 , en la que el α -Gal A humano es internalizado por células a través de la manosa o el receptor de manosa - 6 - fosfato .
- 15 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-14 , que comprende además un cargador aceptable farmacéutico, en la que la composición tiene un pH inferior a 6,5 .
- 55 16 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-15 , que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable .
- 60 17 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 16 , en la que el excipiente se selecciona de un tampón , un aminoácido , urea , un alcohol , ácido ascórbico , un fosfolípido , una proteína , EDTA , cloruro de sodio , liposomas , polivinilpirrolidona , manitol , sorbitol , glicerol , propilenglicol y polietilenglicol (PEG) .
- 18 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 17 , en la que el tampón se selecciona de tampón de citrato , tampón de fosfato , tampón de acetato y tampón de bicarbonato .
- 19 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 17 , en l que la proteína se selecciona a partir de suero de albúmina y gelatina .
- 65 20 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 17 , en la que el PEG se selecciona a partir de PEG – 4000 y PEG - 6000 .

21 . La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-20 , en la que la enzima α -Gal A humana se administra a una dosis de 0,01-100 mg / Kg. de peso corporal .

CTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGA
GATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCA
GTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTA
ATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGA
CTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCAC
AGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGA

FIG. 1

ATTGGTCCGCCCCTGAGGTTAATCTTAAAAG

SacII

CCCAGGTTACCCGCGGAAATTTATGCTGTC
CGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACC
CAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCT
TCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATC
CCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTG

NcoI

GCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCAC
TGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCC
AGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCA

FIG. 2

1 CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC
 61 ATCTGGGCTG CGCGCTTGCG CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG
 121 CTAGAGCACT GGACAAATGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC
 181 GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCAGT GAGAAGCTCT
 241 TCATGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC
 301 TCTGCATTGA TGACTGTTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTC AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG
 361 ACCCTCAGCG CTTCTCTCAT GGGATTGCGC AGCTAGCTAA TTATGTTTAC AGCAAAGGAC
 421 TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA ATAAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT
 481 TTGGATACTA CGACATTGAT GCCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAAT
 541 TTGATGGTTG TTACTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCCT
 601 TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT
 661 GGCCCTTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAAATT
 721 TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA
 781 ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG
 841 TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCTGGGCTA
 901 TCATGGCTGC TCCTTTATTC ATGTCTAATG ACCTCCGACA CATCAGCCCT CAAGCCAAAG
 961 CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGGT
 1021 ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT
 1081 GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATCGCAG
 1141 TTGCTTCCCT GGGTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTTATCACA CAGCTCCTCC
 1201 CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGACTTCAAG GTTAAGAAGT CACATAAATC
 1261 CCACAGGCAC TGTTTTGCTT CAGCTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC
 1321 TTTAAAAAAA AAAAAAACTC GAG

FIG. 3

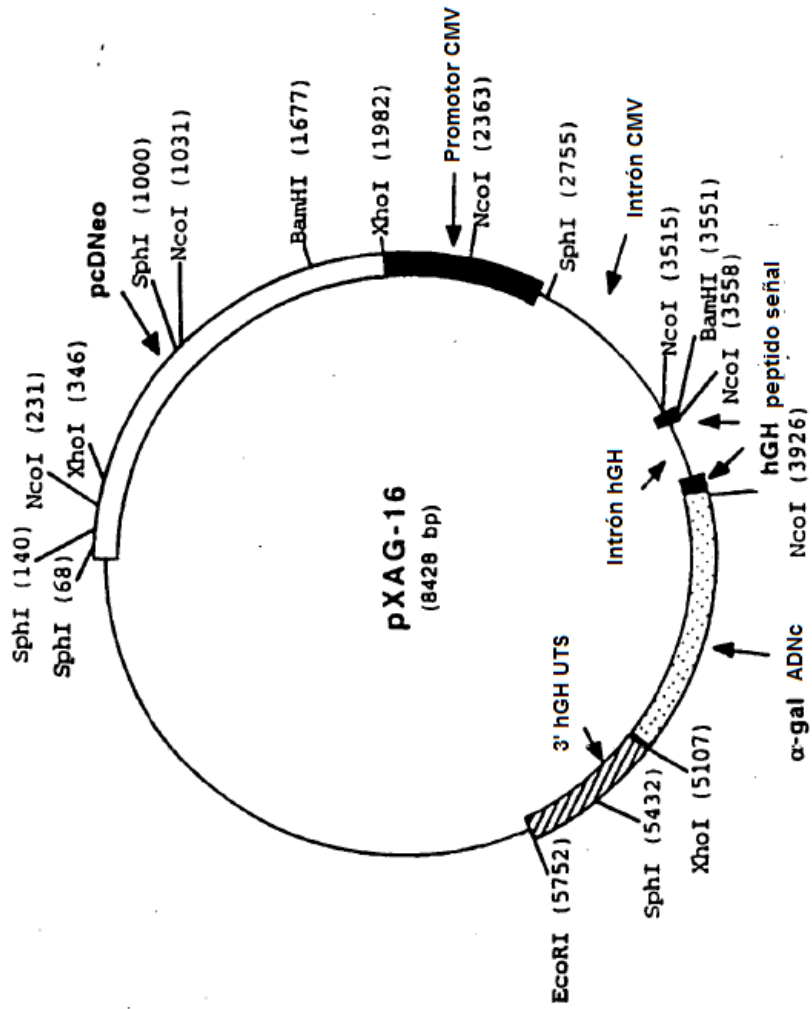


FIG. 4

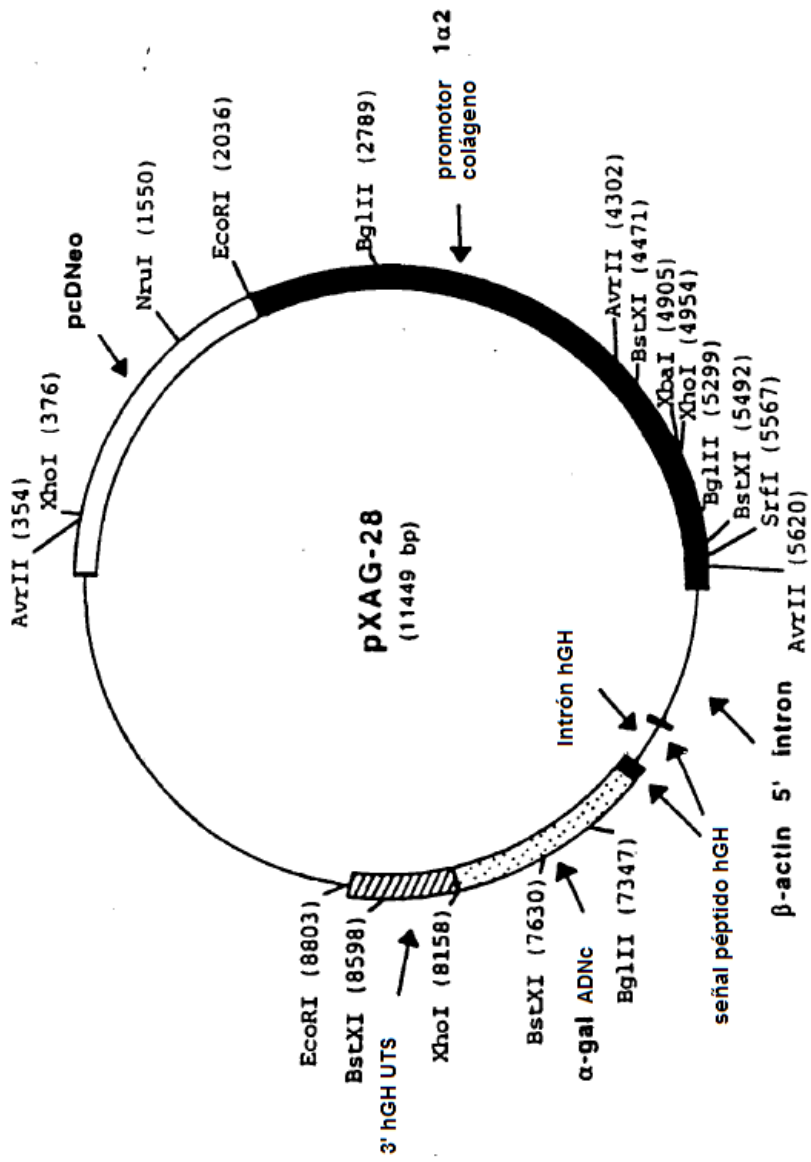


FIG. 5

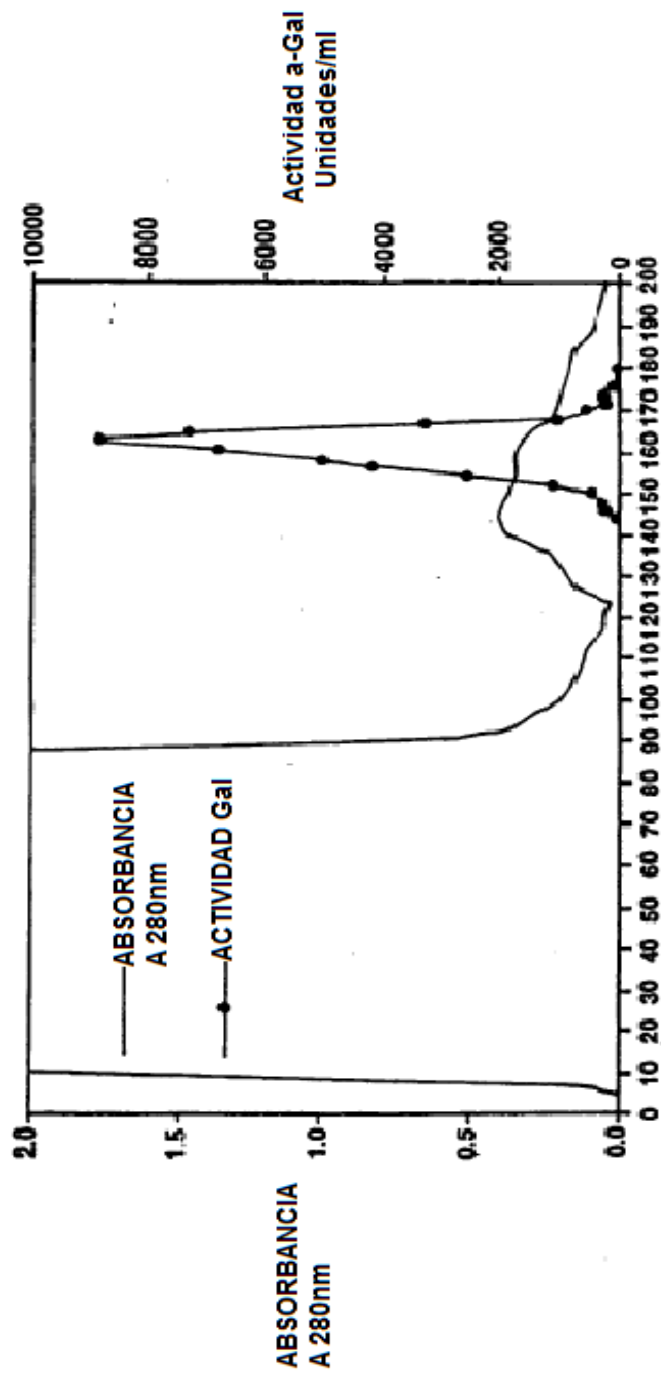


FIG. 6

NÚMERO DE FRACCIÓN

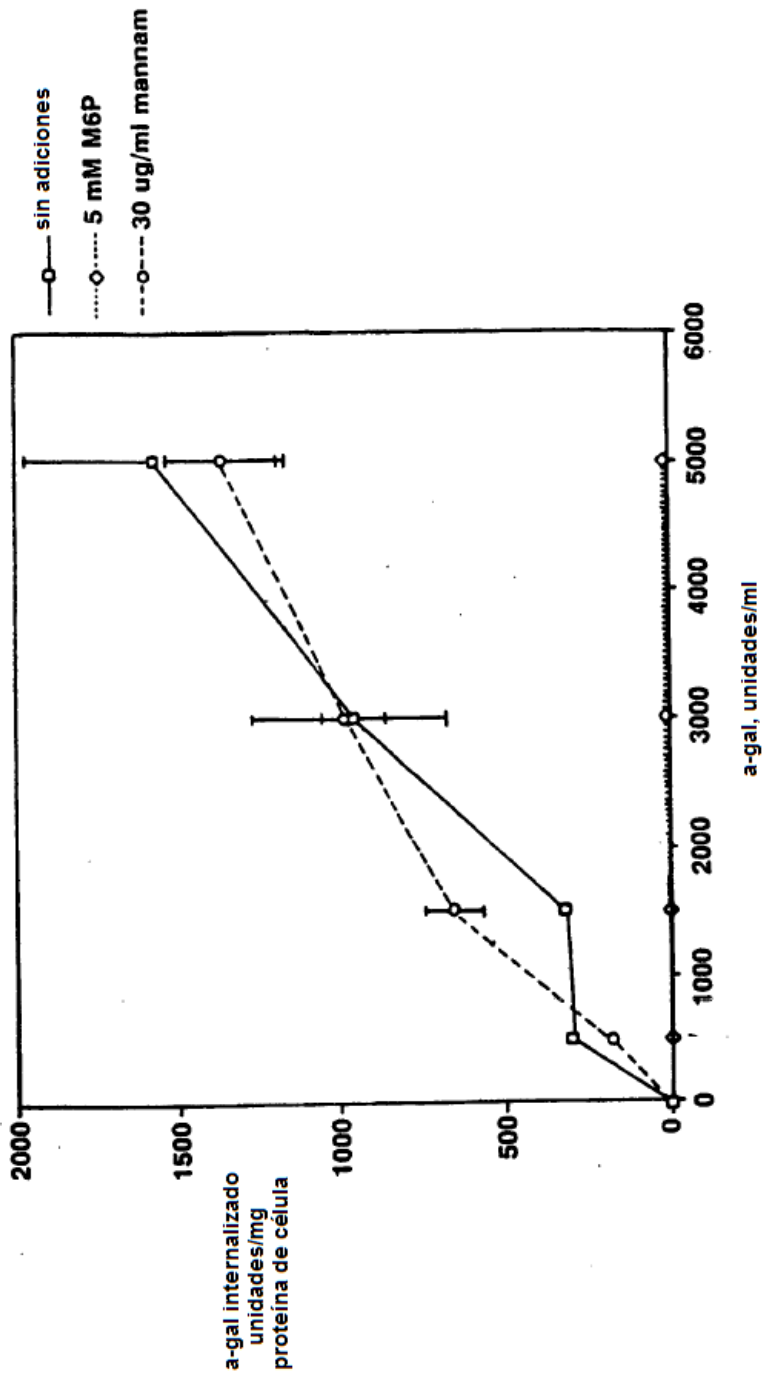


FIG. 7

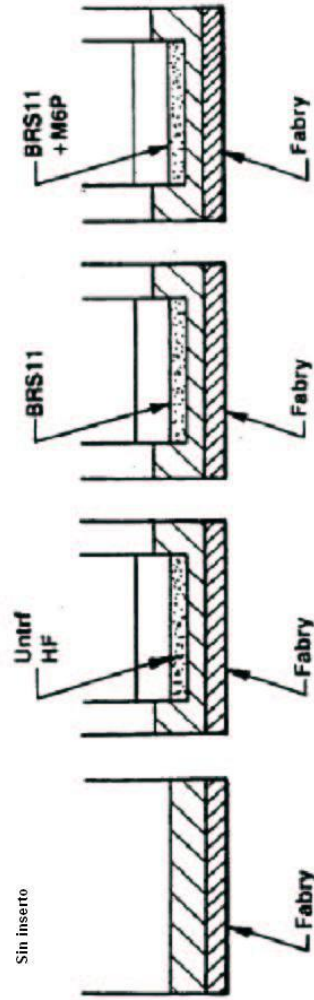


FIG. 8

Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	Ala	Arg	Thr	Pro	Thr	Met	Gly
Trp	Leu	His	Trp	Glu	Arg	Phe	Met	Cys	Asn	Leu	Asp
Cys	Gln	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Cys	Ile	Ser	Glu	Lys
Leu	Phe	Met	Glu	Met	Ala	Glu	Leu	Met	Val	Ser	Glu
Gly	Trp	Lys	Asp	Ala	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Cys	Ile
Asp	Asp	Cys	Trp	Met	Ala	Pro	Gln	Arg	Asp	Ser	Glu
Gly	Arg	Leu	Gln	Ala	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Pro	His
Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Asn	Tyr	Val	His	Ser	Lys
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Val	Gly	Asn
Lys	Thr	Cys	Ala	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Phe	Gly	Tyr
Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe	Ala	Asp	Trp	Gly
Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	Cys	Tyr	Cys	Asp
Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	His	Met
Ser	Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Val
Tyr	Ser	Cys	Glu	Trp	Pro	Leu	Tyr	Met	Trp	Pro	Phe
Gln	Lys	Pro	Asn	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Cys
Asn	His	Trp	Arg	Asn	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ser
Trp	Lys	Ser	Ile	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Trp	Thr	Ser
Phe	Asn	Gln	Glu	Arg	Ile	Val	Asp	Val	Ala	Gly	Pro
Gly	Gly	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Val	Ile	Gly
Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Gln
Met	Ala	Leu	Trp	Ala	Ile	Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Phe
Met	Ser	Asn	Asp	Leu	Arg	His	Ile	Ser	Pro	Gln	Ala
Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Ala	Ile
Asn	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	Lys	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu
Arg	Gln	Gly	Asp	Asn	Phe	Glu	Val	Trp	Glu	Arg	Pro
Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Met	Ile	Asn
Arg	Gln	Glu	Ile	Gly	Gly	Pro	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile
Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Val	Ala	Cys	Asn
Pro	Ala	Cys	Phe	Ile	Thr	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Lys
Arg	Lys	Leu	Gly	Phe	Tyr	Glu	Trp	Thr	Ser	Arg	Leu
Arg	Ser	His	Ile	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Val	Leu	Leu
Gln	Leu	Glu	Asn	Thr	Met	Gln	Met	Ser	Leu	Lys	Asp
Leu	Leu										

FIG. 9

ATGGCTACAG GTAAGCGCCC CTAAAATCCC TTGGGCACA
ATGTGTCCTG AGGGGAGAGG CAGCGACCTG TAGATGGGAC
GGGGGCACTA ACCCTCAGGT TTGGGGCTTC TGAATGTGAG
TATCGCCATG TAAGCCCAGT ATTGGCCAA TCTCAGAAAG
CTCCTGGTCC CTGGAGGGAT GGAGAGAGAA AAACAAACAG
CTCCTGGAGC AGGGAGAGTG CTGGCCTCTT GCTCTCCGGC
TCCCTCTGTT GCCCTCTGGT TTCTCCCCAG GCTCCCCGGAC
 GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG
 CTTCAAGAGG GCAGTGCC

FIG. 10

ATGGCTACAG GCTCCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG
 GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG CTTCAAGAGG GCAGTGCC

FIG. 11

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala
 Phe Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly
 Ser Ala

FIG. 12

1 CTGGACAATG GATTGGCAAG GACGCCTACC ATGGGCTGGC TGCACTGGGA GCGCTTCATG
 61 TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAGCT CTTTCATGGAG
 121 ATGGCAGAGC TCATGGTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT
 181 GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAAAGAGAT TCAGAAGGCCA GACTTCAGGC AGACCCCTCAG
 241 CGCTTTCCTC ATGGGATTCC CCAAGCTAGCT AATTATGTTT ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA
 301 GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGGCCAGGCT TCCCTGGGAG TTTTGGATAC
 361 TACCACATTG ATGCCCAGAC CTTTGGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGGT
 421 TGTACTGTG ACAGTTTGGG AAATTTGGCA GATGGTTATA AGCACATGTC CTTGGCCCTG
 481 AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGTACTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT
 541 CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTGTCTGAC
 601 ATTGATGATT CCTGGAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTTT TAACCAGGAG
 661 AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAAATGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC
 721 AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAGCAAGTA ACTCAGATGG CCTCTGGGC TATCATGGCT
 781 GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAAGCCAA AGCTCTCCTT
 841 CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT
 901 AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA
 961 GCTATGATTA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCGCTCTT ATACCATCGC AGTTGCTTCC
 1021 CTGGGTAAGG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA
 1081 AGGAAGCTAG GGTTCATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC
 1141 ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAAT TAAAAGACTT ACTTTAA

FIG. 13