

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 490**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2011 PCT/US2011/059731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2011 E 11839428 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2638152**

54 Título: **Proteínas beta-glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con estabilidad aumentada y actividad catalítica retenida aumentada**

30 Prioridad:

**08.11.2010 US 411331 P
10.11.2010 US 412180 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2017

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
1 Cedar Brook Drive
Cranbury, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

DO, HUNG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 604 490 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

Proteínas beta-glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con estabilidad aumentada y actividad catalítica retenida aumentada

5

Campo técnico

El campo de esta invención incluye proteínas que son útiles en terapia de remplazo enzimático para diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico. Estas enfermedades de almacenamiento lisosómico incluyen enfermedad de Gaucher.

10

Antecedentes

La β -glucocerebrosidasa es una enzima lisosómica soluble que funciona en la superficie de la membrana luminal a través de interacciones con Saposina C y fosfolípidos aniónicos para hidrolizar el glucolípido glucosilceramida. La β -glucocerebrosidasa es particularmente importante en macrófagos tisulares para descomponer y reciclar las membranas de células dañadas y patógenos absorbidos. Como la glucosilceramida es la molécula precursora principal para más de 300 glucolípidos y gangliósidos que están implicados en numerosas rutas celulares importantes y cascadas de señalización, es esencial mantener el intrincado equilibrio para estas diversas moléculas lipídicas.

15

20

La enfermedad de Gaucher está causada por una deficiencia en β -glucocerebrosidasa que provoca la acumulación de glucosilceramida. La enfermedad de Gaucher se manifiesta en si misma a través de diversos síntomas clínicos incluyendo anemia, trombocitopenia, hepatoesplenomegalia y anomalías esqueléticas. La enfermedad de Gaucher se clasifica en tres categorías basadas en la implicación neurológica: tipo 1 (no neuronopática); tipo 2 (neuronopática aguda); y tipo 3 (neuronopática crónica). No existe cura conocida para la enfermedad de Gaucher, pero la terapia de remplazo enzimático (ERT), que suplementa la β -glucocerebrosidasa deficiente y la terapia de reducción de sustrato que inhibe la síntesis de glucosilceramida son tratamientos aprobados para esta enfermedad. Otros enfoques terapéuticos tales como chaperonas farmacológicas de moléculas pequeña y moduladores del plegamiento proteico también se están evaluando como tratamientos potenciales de esta enfermedad. De estos enfoques de tratamiento, ERT es el tratamiento clínico más establecido y eficaz para los síntomas viscerales de la enfermedad de Gaucher. La imiglucerasa (β -glucocerebrosidasa recombinante; Cerezyme™, Genzyme Corp.™) se desarrolló y aprobó por la FDA en 1994 para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y es actualmente la norma asistencial para esta enfermedad.

25

30

35

Aunque ERT con Cerezyme™ está ampliamente considerado como el tratamiento más eficaz, esta enzima lisosómica no es estable a pH neutro y 37°C. De hecho, la inmensa mayoría del fármaco se inactiva irreversiblemente en la sangre poco después de infusión intravenosa. Solamente la pequeña fracción que retiene actividad catalítica y se internaliza en los macrófagos diana confiere el efecto terapéutico completo. Por tanto, sería ventajoso desarrollar una enzima β -glucocerebrosidasa más estable que no sea tan susceptible a inactivación desde la etapa de producción proteica a través de las condiciones fisiológicas que se encontrarían tras su introducción en un sujeto humano que lo necesite.

40

Las proteínas β -glucocerebrosidasa son conocidas y, por ejemplo, la base de datos UniProt contiene la secuencia de la proteína β -glucocerebrosidasa bovina (n.º de acceso Q2KHZ8); la proteína β -glucocerebrosidasa porcina se describe por Statil *et al.*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **138** (2004) 377-383 y comparada con la secuencia de la proteína humana y O'Neill *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (2009) 5049-5053 compara los genes murino y humano de β -glucocerebrosidasa y las secuencias deducidas de aminoácidos.

45

50

Liou *et al.*, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 4242-4253 se refiere a análisis de β -glucocerebrosidasas variantes que causan la enfermedad de Gaucher.

El documento WO01/49830 y el documento US 2002/0127219 se refieren a enzimas lisosómicas modificadas, incluyendo β -glucocerebrosidasa. Las enzimas modificadas están pretendidas para proporcionar mejora de las enfermedades de almacenamiento lisosómico e incluyen al menos un sitio de glucosilación introducido. Para introducir un sitio de N-glucosilación en un polipéptido GCB precursor, el polipéptido puede contener una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, una sustitución a un resto de asparagina. La sustitución puede conducir a un aumento en la actividad GCB en comparación con el tipo silvestre.

55

60

Sumario

Se proporcionan en este documento proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes caracterizadas por tener estabilidad aumentada respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. También se proporcionan en este documento proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes caracterizadas por retener más actividad catalítica respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes tienen una mutación seleccionada de:

65

F316A y L317F;
H145L;
H145F;
H145L, F316A y L317F;
K321A; y
K321V;

respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Se describen en este documento métodos de preparación de las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes caracterizadas por retener más actividad catalítica respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Se describen adicionalmente en este documento composiciones que comprenden las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan en este documento composiciones que comprenden las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes y un tampón farmacéuticamente aceptable.

Se describen en este documento proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes que tienen remplazo de los aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región del bucle1 de la proteína, el remplazo de aminoácidos caracterizados por tener una conformación de cadena lateral que aumenta el orden cerca del sitio activo de la proteína. Se describen adicionalmente en este documento proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes que tienen un remplazo del aminoácido A, V o N en la posición 321 en una hélice α cerca del sitio activo ($\alpha 6$) de la proteína, el remplazo de la cadena lateral del aminoácido caracterizado por tener una conformación de cadena lateral que estabiliza esta hélice y extrae el bucle1 adyacente desde el sitio catalítico y tiene una conformación abierta y activa. También se proporcionan en este documento proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes que tienen un remplazo de aminoácido L o F en la posición 145 en la región de enrollamiento aleatorio entre la lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$), el remplazo de la cadena lateral del aminoácido caracterizado por tener una conformación de cadena lateral que facilita mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para estabilidad mejorada.

Se proporciona en este documento una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante como se ha descrito anteriormente para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico, donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico puede ser de Gaucher.

También se proporcionan en este documento compuestos que comprenden una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

También se proporcionan en este documento proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes caracterizadas como capaces de una expresión aumentada respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.

También se proporcionan en este documento métodos de preparación de un compuesto que comprende una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. También se proporcionan en este documento métodos de preparación de un ácido nucleico que codifica una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

Breve descripción de los dibujos

Los aspectos anteriores y otros aspectos de la presente invención son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención cuando se considera junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que son actualmente preferidas, entendiéndose, sin embargo, que la invención no está limitada a los instrumentos especificados descritos. Los dibujos no están necesariamente dibujados a escala. En los dibujos:

La Figura 1 (A) muestra mediciones de actividad enzimática para comparar la expresión relativa de proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con la enzima de tipo silvestre secretada en medio de cultivo celular a partir de un experimento típico de transfección transitoria después de 48 h; (B) muestra un análisis de transferencia de Western para comparar las cantidades relativas de proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes, secretadas y la proteína GlcCerasa de tipo silvestre en medio de cultivo celular después de transfección transitoria.

La Figura 2 muestra la estabilidad de proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con la modificación

H145L, la modificación H145F, las modificaciones F316A/L317F, la modificación K321N, la modificación K321A, las modificaciones F316A/L317F/K321N y las modificaciones H145L/K321N en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre a pH 7,5 y 37°C; y

- 5 La Figura 3 muestra la estabilidad de la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las modificaciones F316A/L317F en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre a pH 8 y 37°C.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

10 La presente materia puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada tomada en relación a las figuras adjuntas y ejemplos, que forman una parte de la descripción.

15 Además, como se usa en la memoria descriptiva incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen el plural, y referencias a un valor numérico particular incluyen al menos ese valor particular, salvo que el contexto estipule claramente otra cosa. El término "pluralidad", como se usa en este documento, significa más de uno. Cuando se expresa un intervalo de valores, otra realización incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. Asimismo, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del precedente "aproximadamente", se entiende que el valor particular forma otra realización. Todos los intervalos son inclusivos y combinables.

20 Se proporcionan ejemplos para ayudar a comprender adicionalmente las invenciones. Los materiales particulares usados, protocolos y condiciones pretenden ser adicionalmente ilustrativos de las invenciones y no deben interpretarse como limitantes del alcance razonable de las mismas.

25 Salvo que se indique de forma diferente, las propiedades de la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante se establecen respecto a las propiedades de la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). En este documento, "GlcCerasa" es una abreviatura usada para β -glucocerebrosidasa. Todos los números de aminoácido son respecto a la SEQ ID NO: 1. Por tanto, la posición 145 sería el 145º aminoácido que existe en la SEQ ID NO: 1. Además, las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes descritas en este documento también incluyen fragmentos funcionales o derivados de las mismas.

30 En este documento, se entiende que "pH aproximadamente neutro" incluye los pH que se consideran normalmente pH fisiológicos (es decir, un pH de aproximadamente 7,5 a 37°C).

35 Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes adecuadas pueden caracterizarse por tener expresión proteica y secreción en medio de cultivo celular similar o aumentada respecto a proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, de tipo silvestre durante cultivo celular y producción proteica. Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes adecuadas pueden caracterizarse por tener estabilidad aumentada respecto a proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, de tipo silvestre. Estas proteínas tienen estabilidad aumentada a condiciones fisiológicas y esas condiciones fisiológicas pueden ser *in vivo*. Además, estas proteínas también pueden caracterizarse por tener estabilidad aumentada en condiciones de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C. Esta estabilidad aumentada puede controlarse en condiciones de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C durante un periodo de aproximadamente tres horas. La estabilidad aumentada se retiene en medio de cultivo celular y puede retenerse dentro de las células. Estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada dentro del lisosoma y dentro del lisosoma las condiciones pueden ser de aproximadamente pH 5 y aproximadamente 37°C. Estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada que se caracteriza por degradación proteolítica reducida y la degradación proteolítica reducida puede suceder en las células. Además, la degradación proteolítica reducida puede ser en el lisosoma en las células. Estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada a condiciones no fisiológicas tales como en soluciones tamponantes durante la purificación de proteínas. Estas soluciones tamponantes pueden tener un pH mayor de aproximadamente 7 o un pH menor de aproximadamente 3 durante la purificación de proteínas. Estas soluciones tamponantes también pueden contener disolventes orgánicos o sales caotrópicas. Estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada en soluciones tamponantes a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 37°C. Además, estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada en soluciones tamponantes a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. Además, estas proteínas pueden tener estabilidad aumentada en soluciones tamponantes a una temperatura de aproximadamente 20°C. Estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada después de ciclos de congelación-descongelación o reconstitución después de liofilización. Estas proteínas también pueden tener estabilidad aumentada en un tampón de formulación de fármacos tal como solución salina.

60 Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes adecuadas pueden caracterizarse por retener más actividad catalítica respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas tienen más actividad catalítica retenida en condiciones fisiológicas y la mayor actividad catalítica retenida puede ser *in vivo*. Además, estas proteínas también pueden caracterizarse por tener más actividad catalítica retenida en condiciones de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C. Esta mayor actividad catalítica retenida puede controlarse

a condiciones de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C durante un periodo de aproximadamente dos horas. Estas proteínas tienen más actividad catalítica retenida en medio de cultivo celular y la mayor actividad catalítica retenida puede ser dentro de las células. Además, estas proteínas pueden tener más actividad catalítica retenida dentro del lisosoma y dentro del lisosoma las condiciones pueden ser de aproximadamente pH 5 y aproximadamente 37°C. Estas proteínas también pueden tener más actividad catalítica retenida que se caracteriza por degradación proteolítica reducida y la degradación proteolítica reducida puede existir en las células. Además, la degradación proteolítica reducida puede ser en el lisosoma en las células. Estas proteínas también pueden tener más actividad catalítica retenida en condiciones no fisiológicas tales como en soluciones tamponantes durante la purificación proteica. Estas soluciones tamponantes pueden tener un pH mayor de aproximadamente 7 o un pH menor de aproximadamente 3 durante la purificación proteica. Estas soluciones tamponantes también pueden contener disolventes orgánicos o sales caotrópicas. Estas proteínas también pueden tener más actividad catalítica retenida a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 37°C. Además, estas proteínas pueden tener también más actividad catalítica retenida a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. Además, estas proteínas pueden tener más actividad catalítica retenida a una temperatura de aproximadamente 20°C. Estas proteínas también pueden tener más actividad catalítica retenida después de ciclos de congelación-descongelación o reconstitución después de liofilización. Estas proteínas también pueden tener más actividad catalítica retenida en un tampón de formulación de fármacos tal como solución salina.

Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes pueden tener la variación o variaciones de aminoácidos: (1) F316A y L317F; o (3) H145L; o (4) H145F; o (5) F316A, L317F, y K321N; o (6) K321A; o (7) K321V; (8) F316A, L317F, y K321A; o (9) F316A, L317F, y K321V; o (10) H145L, F316A, y L317F; o (11) H145L y K321N; o (12) H145L y K321A; o (13) H145L y K321V. Algunas de estas proteínas también pueden caracterizarse por tener expresión proteica y secreción en medio de cultivo celular similar o aumentada respecto a proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, de tipo silvestre durante cultivo celular y producción proteica. Estas proteínas también pueden caracterizarse por tener estabilidad aumentada respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden caracterizarse por tener estabilidad aumentada a condiciones fisiológicas y estas condiciones son de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C. Estas proteínas también pueden caracterizarse por retener más actividad catalítica respecto a β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La actividad catalítica puede medirse después de incubación a condiciones de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C durante un periodo de aproximadamente dos horas. Estas proteínas también pueden caracterizarse por retener más actividad catalítica a condiciones fisiológicas. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones de aminoácidos F316A y L317F tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 2 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación de aminoácido K321N tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 3 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación de aminoácido K321A tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 3 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación de aminoácido K321V tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 1,4 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación de aminoácido H145L tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 3 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación de aminoácido H145F tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 2 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones de aminoácidos F316A, L317F, y K321N tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 3 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones de aminoácidos H145L, F316A, y L317F tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 2 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones de aminoácidos H145L y K321N tiene una semivida aparente prolongada de al menos aproximadamente 3 veces más larga que β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Esta semivida aparente prolongada puede medirse después de incubación a condiciones de aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C durante un periodo de aproximadamente dos horas.

Ejemplo 1

Reactivos

Se adquirió sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido (4MUG) de Research Products International (Mt. Prospect, IL). Los kits de extracción de gel de ADN y Miniprep DNA® fueron de QIAGEN® (Valencia, CA). El kit PureYield Maxiprep DNA™ fue de Promega™ (Madison, WI). Salvo que se establezca de otro modo, los agentes químicos fueron de Sigma™ (St. Louis, MO). El reactivo de transfección Fugene-HD™ fue de Roche™ (Indianapolis, IN). El vector de expresión en mamíferos pEF6/V5-HisA™, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero bovino fetal (FBS) y otros reactivos de cultivo tisular fueron de Invitrogen™ (Carlsbad, CA). El ADNc de β -glucocerebrosidasa de tipo silvestre humana (NM_000157.3) se adquirió de Origene™ (Rockville, MD). Las endonucleasas de restricción, la ADN polimerasa Phusion-HF™, la ADN ligasa T4, la fosfatasa Antarctic, las células

de *E. coli* químicamente competentes (células DH5 α) y las endoglucosidasas PNGasaF y EndoH se adquirieron todas de New England Biolabs™ (Ipswich, MA). Las células renales embrionarias humanas (transformadas con el antígeno T; HEK293T) fueron de ATCC™.

5 Ensayos

Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes y la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre se ensayaron todas por expresión transitoria en una línea celular humana (HEK293T) para evaluar la expresión proteica. El sistema indicador para ensayar la actividad catalítica de las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes o la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre fue la capacidad de hidrolizar el sustrato fluorogénico 4-MU- β -glucosa a aproximadamente pH 5,2 y aproximadamente 37°C. La estabilidad de estas proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes y la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada se ensayó controlando la retención de la actividad catalítica de cada proteína después de incubación a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C durante un periodo de aproximadamente 3 horas. Las condiciones en estos experimentos se diseñaron para parecerse al entorno que existiría durante la infusión intravenosa de la terapia de remplazo enzimático con proteína β -glucocerebrosidasa en un paciente.

Más específicamente, pero de ningún a interpretarse como limitante, se sembraron células HEK293T en placas de cultivo tisular de 12 pocillos con 1 ml de medio DMEM suplementado con FBS al 10% y se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Cuando las células HEK293T alcanzaron el 80-90% de confluencia, el medio consumido se reemplazó con 1 ml de medio DMEM/FBS al 10% fresco y cada pocillo se transfectó con 1 μ g de ADN plasmídico para proteínas β -glucocerebrosidasa individuales o PBS (para un control negativo transfectado de forma simulada) y 3 μ l de reactivo de transfección Fugene-HD de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células transfectadas se incubaron durante 24-72 horas y se comprobaron diariamente para la expresión de proteína β -glucocerebrosidasa recombinante (secretada en el medio) mediante ensayos de actividad enzimática.

Se evaluó la expresión proteica de β -glucocerebrosidasa (y la secreción en el medio de cultivo celular) por ensayos de actividad enzimática usando medio condicionado de experimentos de transfección transitoria después de 24, 48 o 72 h y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido (4-MUG). En resumen, se recogieron 20 μ l de medio condicionado de cada muestra en los puntos temporales indicados y se diluyeron con 80 μ l de tampón McIlvane (tampón MI: citrato sódico 50 mM/ fosfato sódico (pH 5,2)/Triton X-100 al 0,25% (v/v)/taurocolato sódico al 0,25% (p/v)) en tubos de microcentrifuga de 0,5 ml. Se hicieron alícuotas de veinticinco μ l de cada muestra diluida en pocillos individuales de placas de fondo transparente negro de 96 pocillos (realizado por triplicado) y se añadieron 50 μ l de sustrato 4-MUG 6 mM (preparado en tampón MI) a cada pocillo mediante un pipeteador multicanal. Las placas después se precintaron con cinta de cobertura y se incubaron a 37°C durante 1 h. Las reacciones enzimáticas se detuvieron añadiendo 125 μ l de NaOH 0,1 M y la fluorescencia 4-MU liberada se leyó en un lector de placa de fluorescencia usando longitudes de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm, respectivamente. La fluorescencia 4-MU de la muestra transfectada de forma simulada sirvió como control de "fondo" y se sustrajo de todas las muestras de proteína β -glucocerebrosidasa.

Para estimar la cantidad de proteínas β -glucocerebrosidasa ácida de tipo silvestre y variantes presentes en el medio de cultivo celular, los medios de cultivo celular condicionado de experimentos de transfección transitoria se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa usando técnicas convencionales. La membrana después se incubó con tampón de bloqueo: leche desnatada al 4% (p/v) en solución salina tamponada con TRIS 50 mM (pH 7,5)/Tween-20 al 0,1% (v/v) (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. La membrana se incubó posteriormente con anticuerpos policlonales primarios de conejo anti- β -glucocerebrosidasa humana (creados contra un péptido de 19 aminoácidos correspondiente al extremo C-terminal de β -glucocerebrosidasa ácida humana; Sigma G-4171) diluidos 1:2500 en tampón de bloqueo durante 1 h a temp. ambiente o durante una noche a 4°C con agitación. La transferencia después se lavó con TBST a temp. ambiente con agitación y al menos tres cambios de tampón durante 1 h. La transferencia después se incubó con un anticuerpo secundario ligado a enzima (por ejemplo, anticuerpos de carba conjugados con peroxidasa de rábano rústico anti-conejo) diluidos 1:10.000 en tampón de bloqueo durante 1 h a temp. ambiente con agitación. La transferencia se lavó con TBST a temp. ambiente con agitación y al menos tres cambios de tampón durante 1 h. La transferencia después se incubó con sustrato de quimioluminiscencia (por ejemplo, Pierce's Supersignal West-Dura Extended Duration Substrate™) durante 5 min a temp. ambiente y se visualizó por un sistema de imágenes o por película para evaluar el nivel de expresión proteica para enzimas β -glucocerebrosidasa ácida de tipo silvestre y variantes.

Para evaluar la estabilidad de la proteína β -glucocerebrosidasa, las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes expresadas de forma transitoria y la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada (es decir Cerezyme™) se incubaron en tampón de pH neutro a 37°C y se ensayaron para la actividad enzimática para determinar el grado de pérdida de actividad catalítica durante un periodo de aproximadamente tres horas. En resumen, se recogieron 60 μ l de medio condicionado (que contenía proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes individuales) después de 24 o 48 h después de la transfección y se añadieron a 420 μ l de

fosfato potásico 0,1 M (pH 7,5)/Triton X-100 al 0,2% (v/v)/BSA al 0,2% (p/v) en tubos de microcentrifuga de 0,5 ml. Asimismo, la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada se diluyó en serie hasta 1:12.500 en medio DMEM/FBS al 10% y se añadieron 60 μ l de esta muestra proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre diluida a 420 μ l de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,5)/Triton X-100 al 0,2% (v/v)/BSA al 0,2% (p/v) para obtener una dilución final de 1:100.000. (Esta cantidad de proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre se determinó empíricamente para que contuviera cantidades similares de actividad enzimática a las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes expresadas de forma transitoria). Todas las muestras se incubaron en un baño de agua de 37°C y se retiraron 70 μ l de cada muestra en puntos temporales especificados (0, 30, 60, 90, 120 o 180 min) y se añadieron a tubos nuevos de microcentrifuga de 0,5 ml que contenían 20 μ l de NaOAc 0,5 M (pH 5,2). Las muestras se mezclaron minuciosamente y se usaron 25 μ l de cada muestra diluida para medir la actividad enzimática residual de la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante (por triplicado) como se ha descrito anteriormente. La actividad enzimática inicial (a t = 0 min) se designó como el 100% para cada proteína β -glucocerebrosidasa recombinante mientras que las actividades enzimáticas para todos los puntos temporales posteriores se normalizaron a la actividad inicial para determinar la actividad enzimática residual sobre el curso completo de tiempo. Se usaron los datos de múltiples experimentos (al menos 2 experimentos diferentes) para obtener valores promedio para actividad residual de proteína β -glucocerebrosidasa recombinante para puntos temporales individuales y se representaron en gráfico respecto al tiempo de incubación, como se muestra.

20 Ejemplo 2

Se comparó la expresión de proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con sustituciones específicas de aminoácidos con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando experimentos de transfección transitoria descritos anteriormente (Figura 1). Como puede observarse en la Figura 1A, la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones F316A y L317F ("GlcCerasa-F316A/L317F"), la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación K321N ("GlcCerasa-K321N"), la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación H145L ("GlcCerasa-H145L"), las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con las variaciones F316A, L317F y K321N ("GlcCerasa-F316A/L317F/K321N"), las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con las variaciones H145L y K321N ("GlcCerasa-H145L/K321N") se expresaron de forma transitoria con la GlcCerasa de tipo silvestre en células HEK293T. El medio de cultivo celular condicionado se recogió 48 horas después de la transfección y se ensayó para la actividad enzimática β -glucocerebrosidasa usando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido (4-MUG) para evaluar el nivel relativo de expresión de estas enzimas GlcCerasa variantes en comparación con la GlcCerasa de tipo silvestre. Estos resultados demuestran que se expresaban diferentes enzimas GlcCerasa variantes tan bien o mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre, como se evidencia por la mayor actividad enzimática medida en el medio de cultivo celular. También se expresaban otras enzimas GlcCerasa variantes incluyendo GlcCerasa-H145F, GlcCerasa-H145L/F316A/L317F/K321N mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre (datos no mostrados). La GlcCerasa-K321A y GlcCerasa-H145F/F316A/L317F/K321N se expresaban a aproximadamente el mismo nivel que la GlcCerasa de tipo silvestre mientras que la GlcCerasa-K321V se expresaba de forma menor eficaz que la GlcCerasa de tipo silvestre (datos no mostrados).

La cantidad de proteínas GlcCerasa variantes y GlcCerasa de tipo silvestre presente en medio de cultivo celular condicionado se evaluó usando transferencia de Western como se ha descrito anteriormente. Como puede observarse en la Figura 1B, estaban presentes cantidades mayores de proteínas GlcCerasa-F316A/L317F y GlcCerasa-K321N en medio de cultivo celular condicionado que GlcCerasa de tipo silvestre. Estos datos de transferencia de Western son coherentes con los resultados de actividad enzimática GlcCerasa y confirman que ciertas enzimas GlcCerasa variantes se expresan y secretan mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre. Se observaron resultados similares para otras proteínas GlcCerasa variantes (datos no mostrados).

50 Ejemplo 3

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones F316A y L317F ("GlcCerasa-F316A/L317F") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo de estabilidad *in vitro* descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 2, la GlcCerasa-F316A/L317F es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de dos o tres horas. La GlcCerasa-F316A/L317F retenía el 85% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-F316A/L317F retenía el 73% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-F316A/L317F retenía el 50% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-F316A/L317F retenía el 34% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-F316A/L317F es de aproximadamente 120 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales. La GlcCerasa-F316A/L317F se ensayó también a aproximadamente pH 8 y aproximadamente 37°C y presentó una tendencia similar (Figura 3). Tanto la GlcCerasa-F316A/L317F como la GlcCerasa de tipo silvestre eran menos estables a aproximadamente pH 8 y aproximadamente 37°C, pero estos resultados confirman que la GlcCerasa-F316A/L317F es más estable a mayor pH que la GlcCerasa de tipo silvestre.

10 Ejemplo 4

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación K321N ("GlcCerasa-K321N") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 2, la GlcCerasa-K321N es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-K321N retenía el 104% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321N retenía el 91% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321N retenía el 76% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321N retenía el 54% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-K321N es de aproximadamente 180 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

30 Ejemplo 5

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación H145L ("GlcCerasa-H145L") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 2, la GlcCerasa-H145L es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-H145L retenía el 92% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L retenía el 87% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L retenía el 62% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L retenía el 42% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-H145L es de aproximadamente 160 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

55 Ejemplo 6

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación H145F ("GlcCerasa-H145F") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 1, la GlcCerasa-H145F es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-H145F retenía el 94% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145F retenía el 80% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145F retenía el 37% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145F retenía el 17% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación.

incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

- 5 La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-H145F es de aproximadamente 100 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

10 **Ejemplo 7**

15 La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones F316A, L317F, y K321N ("GlcCerasa-F316A/L317F/K321N") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 2, la GlcCerasa-F316A/L317F/K321N es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-F316A/L317F/K321N retenía el 101% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-F316A/L317F/K321N retenía el 91% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-F316A/L317F/K321N retenía el 75% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-F316A/L317F/K321N retenía el 52% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

30 La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-F316A/L317F/K321N es de aproximadamente 180 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

35 **Ejemplo 8**

40 La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones H145L, F316A y L317F ("GlcCerasa-H145L/F316A/L317F") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. La GlcCerasa-H145L/F316A/L317F es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-H145L/F316A/L317F retenía aproximadamente el 77% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L/F316A/L317F retenía el 80% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L/F316A/L317F retenía el 56% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L/F316A/L317F retenía el 39% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

50 La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-H145L/F316A/L317F es de aproximadamente 135 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

55 **Ejemplo 9**

60 La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con las variaciones H145L y K321N ("GlcCerasa-H145L/K321N") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 2, la GlcCerasa-H145L/K321N es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-H145L/K321N retenía el 89% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L/K321N retenía el 86% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L/K321N retenía el 76% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-H145L/K321N retenía el 62% de su actividad inicial después de 180 minutos

de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-H145L/K321N es de aproximadamente 180 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

Ejemplo 10

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación K321A ("GlcCerasa-K321A") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. Como puede observarse en la Figura 2, la GlcCerasa-K321A es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-K321A retenía el 90% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321A retenía el 89% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321A retenía el 68% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321A retenía el 49% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-K321A es de aproximadamente 170 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

Ejemplo 11

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante con la variación K321A ("GlcCerasa-K321V") se comparó con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre purificada ("GlcCerasa de tipo silvestre") usando el ensayo descrito anteriormente. Las condiciones usadas para las proteínas variantes y de tipo silvestre fueron idénticas. La GlcCerasa-K321V es significativamente más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre a aproximadamente pH neutro y aproximadamente 37°C sobre un curso de tiempo de tres horas. La GlcCerasa-K321V retenía el 74% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321V retenía el 55% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321V retenía el 29% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa-K321V retenía el 15% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación. Por comparación, la GlcCerasa de tipo silvestre tratada en las mismas condiciones experimentales retenía el 68% de su actividad inicial después de 30 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 46% de su actividad inicial después de 60 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 20% de su actividad inicial después de 120 minutos de incubación. La GlcCerasa de tipo silvestre retenía el 8% de su actividad inicial después de 180 minutos de incubación.

La semivida estimada (definida operativamente en este estudio como el tiempo de incubación a aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente 37°C que provocaba una pérdida del 50% de la actividad enzimática inicial) para la GlcCerasa-K321V es de aproximadamente 70 minutos mientras que la semivida estimada para la GlcCerasa de tipo silvestre es de aproximadamente 50 minutos en estas condiciones experimentales.

Los resultados anteriores se resumen en la Tabla 1

Tabla 1

Proteína GlcCerasa recombinante	n =	Actividad residual (3 h)	Semivida estimada	Mejora factorial
Tipo silvestre	7	8%	~50 min	-
H145L	4	42%	~160 min	3,2
H145F	2	17%	~100 min	2,0
F316A/L317F	4	34%	~120 min	2,4
K321N	4	54%	>180 min	>3,6
K321A	2	49%	~170 min	3,4
K321V	1	15%	~70 min	1,4

F316A/L317F/K321N	5	52%	>180 min	>3,6
H145L/ F316A/L317F	1	39%	~135 min	2,7
H145L/K321N	2	62%	>180 min	>3,6

La actividad residual es la cantidad de actividad enzimática que permanece después de la incubación de tres horas y se expresa como el porcentaje de la actividad enzimática inicial (a t=0 min) para cada proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante en el ensayo de estabilidad. Cada proteína β -glucocerebrosidasa recombinante se ensayó en al menos dos experimentos diferentes (indicados por n en la Tabla 1) para determinar las actividades residuales promedio durante el curso de tiempo de tres horas excepto para la GlcCerasa-K321V y la GlcCerasa-H145L/F316A/L317F que se ensayaron solamente una vez. La mejora factorial se refiere al aumento en las semividas aparentes de las proteínas GlcCerasa recombinantes, variantes respecto a la proteína GlcCerasa recombinante, de tipo silvestre purificada.

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante que tiene una variación de aminoácido en la posición 145, 316, 317 o 321 o la GlcCerasa-F316A/L317F, GlcCerasa-K321N, GlcCerasa-K321A, GlcCerasa-K321V, GlcCerasa-H145L, GlcCerasa-H145F, o GlcCerasa-F316A/L317F/K321N o GlcCerasa-F316A/L317F/K321A o GlcCerasa-F316A/L317F/K321V o GlcCerasa-H145L/F316A/L317F o GlcCerasa-H145L/K321N que puede caracterizarse por retener más actividad catalítica respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre podrían prepararse en células de levadura, células vegetales, células de mamífero o animales transgénicos usando técnicas de biología molecular y de purificación de proteínas conocidas para los expertos en la materia.

Una composición que comprende la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante que tiene una variación de aminoácido en la posición 145, 316, 317 o 321 o la GlcCerasa-F316A/L317F, GlcCerasa-K321N, GlcCerasa-K321A, GlcCerasa-K321V, GlcCerasa-H145L, GlcCerasa-H145F, o GlcCerasa-F316A/L317F/K321N o GlcCerasa-F316A/L317F/K321A o GlcCerasa-F316A/L317F/K321V o GlcCerasa-H145L/F316A/L317F o GlcCerasa-H145L/K321N y un vehículo farmacéuticamente aceptable podría prepararse usando vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos para los expertos en la materia.

Una composición que comprende la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante que tiene una variación de aminoácido en la posición 145, 316, 317 o 321 o la GlcCerasa-F316A/L317F, GlcCerasa-K321N, GlcCerasa-K321A, GlcCerasa-K321V, GlcCerasa-H145L, GlcCerasa-H145F, o GlcCerasa-F316A/L317F/K321N o GlcCerasa-F316A/L317F/K321A o GlcCerasa-F316A/L317F/K321V o GlcCerasa-H145L/F316A/L317F o GlcCerasa-H145L/K321N y un tampón farmacéuticamente aceptable podría prepararse usando tampones farmacéuticamente aceptables conocidos para los expertos en la materia.

Ejemplo 12

Como la proteína GlcCerasa es estable a pH ácido y muy eficaz en eliminar el sustrato glucosilceramida acumulado dentro de los lisosomas, se puede desarrollar una ERT con GlcCerasa más estable que puede resistir mejor el entorno desfavorable (pH neutro) para retener su actividad catalítica de modo que se suministre una cantidad mayor de fármaco activo a los lisosomas para una eficacia mejorada. La enzima GlcCerasa puede estabilizarse a aproximadamente pH neutro cuando se une (e inhibe) por el inhibidor enzimático de sitio activo isofagomina (IFG). La estabilidad de la proteína para la GlcCerasa recombinante a aproximadamente pH neutro se mejora significativamente con IFG, como se evidencia por un aumento de hasta 15°C en la temperatura de fusión térmica (T_m). Se cree que el mecanismo de acción para la estabilización de GlcCerasa inducida por IFG resulta de la red extensiva de enlaces de hidrógeno entre IFG y seis restos de sitio activo de GlcCerasa para restringir el desplegamiento del sitio activo y las regiones adyacentes para mantener una conformación de GlcCerasa más estable. Mantener la apropiada estructura de GlcCerasa en el sitio activo y las regiones adyacentes ayuda a la actividad catalítica y la estabilidad global de GlcCerasa. Varias modificaciones diferentes en GlcCerasa pueden ayudar a retener la actividad catalítica y mantener una estructura proteica más estable a aproximadamente pH neutro. En este documento se proporciona la construcción de una serie de diferentes enzimas GlcCerasa con sustituciones específicas de aminoácidos en localizaciones estratégicas dentro de estructuras de bucle cerca del sitio activo para ayudar a formar una región más ordenada cerca del sitio activo que son menos propensas a desenrollarse a aproximadamente pH neutro. Además, en este documento se proporcionan modificaciones en una hélice α cerca del sitio activo que pueden ayudar a mover esta hélice y un bucle adyacente desde el sitio catalítico para mantener una conformación abierta y activa.

Se utilizó una aproximación para generar una serie de enzimas GlcCerasa modificadas que se había predicho que tenían estabilidad proteica superior que la GlcCerasa de tipo silvestre. En primer lugar, se usaron dos estrategias diferentes pero complementarias: (1) modificación de ciertos bucles y hélices cerca del sitio catalítico para imitar las conformaciones preferidas de GlcCerasa activa sin inhibir realmente la enzima; y (2) modificación de una región de enrollamiento aleatorio que puede potenciar las interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad proteica mejorada.

En un ejemplo, se modificaron varios restos dentro de la región del bucle 1 (posiciones 311-319) para ayudar a formar una región más ordenada cerca del sitio activo que sería menos propensa a desenrollamiento a

aproximadamente pH neutro. Esta variante (GlcCerasa-F316A/L317F) con modificaciones en el bucle 1 demostró ser significativamente más estable que la GlcCerasa a aproximadamente pH 7,5 y 37°C.

5 En un segundo ejemplo, se modificó una hélice α cerca del sitio activo ($\alpha 6$) que pretendía estabilizar esta hélice y ayudar a extraer un bucle adyacente (bucle1) desde el sitio catalítico para mantener una formación abierta y activa. Por tanto, se generaron enzimas GlcCerasa modificadas que contenían una sustitución de aminoácido en la posición 321 para reemplazar un resto cargado de lisina con un resto no cargado dentro de la hélice $\alpha 6$ para promover más interacciones hidrófobas con hélices α y estructuras β adyacentes para estabilizar la proteína. Se analizaron alineaciones de proteínas para enzimas GlcCerasa para diversas especies (Tabla II) y se apreció que un homólogo de GlcCerasa de *B. taurus* (GlcCerasa de toro; código de acceso DAA31806.1) contenía asparagina en la posición 321 (³²¹Asn). Esto sugiere que la lisina en la posición 321 (³²¹Lys) puede reemplazarse potencialmente con un resto de aminoácido diferentes sin anular la actividad catalítica GlcCerasa. La GlcCerasa-K321N retenía aproximadamente el 75% y el 54% de su actividad catalítica original a aproximadamente pH 7,5 y 37°C después de 2 y 3 h, respectivamente. En contraste, la GlcCerasa de tipo silvestre retenía solamente el 21% y el 8% de su actividad inicial en las mismas condiciones. La semivida estimada de la GlcCerasa-K321N fue aproximadamente 3,5 veces más larga que la GlcCerasa de tipo silvestre. Asimismo, la GlcCerasa-K321A retenía aproximadamente el 68% y el 49% de su actividad catalítica original a aproximadamente pH 7 y 37°C después de 2 y 3 h, respectivamente. La semivida estimada de la GlcCerasa-K321A fue aproximadamente 3 veces más larga que la GlcCerasa de tipo silvestre. La GlcCerasa-K321V retenía aproximadamente el 29% y el 15% de su actividad catalítica original a aproximadamente pH 7 y 37°C después de 2 y 3 h, respectivamente. La semivida estimada de la GlcCerasa-K321V fue aproximadamente 1,4 veces más larga que la GlcCerasa de tipo silvestre. Estos datos muestran que retirar un resto de lisina cargado positivamente dentro de la hélice $\alpha 6$ hacía que esta región estuviera más ordenada para limitar el desenrollamiento de esta región para conferir mayor estabilidad proteica de GlcCerasa.

25 En un tercer ejemplo, se modificó una región de enrollamiento aleatorio entre una lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$) que puede facilitar mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad mejorada. El análisis de alineación de proteínas de enzimas GlcCerasa de diversas especies (Tabla 2) reveló que la posición 145 dentro de este enrollamiento aleatorio era divergente entre las diferentes especies. Un homólogo de *B. taurus* y de *S. scrofa* (cerdo) contenían ambos leucina en esta posición mientras que la GlcCerasa murina contiene serina. Por tanto, se sustituyó histidina en la posición 145 (¹⁴⁵His) con Leu (H145L) o Phe (H145F) para determinar si estas modificaciones mejorarían la estabilidad de GlcCerasa. La GlcCerasa GlcCerasa-H145L demostró ser más estable que la GlcCerasa de tipo silvestre y retenía el 62% de su actividad inicial después de 2 h y el 42% después de 3 h con una semivida estimada aproximadamente 3 veces más larga que la semivida de la GlcCerasa de tipo silvestre (160 min frente a 50 min). Asimismo, la GlcCerasa H145F retenía aproximadamente el 37% de su actividad inicial después de 2 h y el 17% después de 3 h con una semivida aproximadamente 2 veces más larga respecto a la GlcCerasa de tipo silvestre. Actualmente no se sabe el modo en que estas modificaciones afectaban a la estructura de la GlcCerasa, pero es posible que reemplazando un resto cargado parcialmente (¹⁴⁵His) con un resto hidrófobo de leucina o fenilalanina se hiciera que esta región estuviera más ordenada para limitar el desenrollamiento de esta región. Como alternativa, estas modificaciones pueden crear un giro y pueden potenciar las interacciones entre estructuras secundarias (por ejemplo, lámina beta $\beta 2$ y hélice $\alpha 2$).

Los datos de alineación de proteínas se resumen en la Tabla 2

Tabla 2

GlcCerasa humana	¹⁴⁰ DDFQLHNFSLPEEDT SEQ ID NO: 17	³¹⁵ DFLAPAKATLGET SEQ ID NO: 21
GlcCerasa de <i>S. scrofa</i>	¹⁴⁰ DDFQLLNFSLPEEDV SEQ ID NO: 18	³¹⁵ DFLAPAKATLGET SEQ ID NO: 22
GlcCerasa de <i>B. taurus</i>	¹⁴⁰ DDFQLLNFSLPEEDV SEQ ID NO: 19	³¹⁵ DFLAPANATLGET SEQ ID NO: 23
GlcCerasa murina	¹⁴⁰ NDFQLSNFSLPEEDT SEQ ID NO: 20	³¹⁵ DFLAPAKATLGET SEQ ID NO: 24

45 Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes adecuadas también pueden tener remplazo de aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el uno o más remplazos de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que aumenta el orden cerca del sitio activo de la proteína. Estas proteínas también pueden tener uno o más remplazos de aminoácidos en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el uno o más remplazos de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que aumenta el orden cerca del sitio activo de la proteína que se caracteriza por ser más estable en un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8 en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener remplazo de aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el remplazo de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que aumenta el orden cerca del sitio activo de la proteína que se caracteriza por ser más estable a aproximadamente pH neutro en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener remplazo de aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el remplazo de aminoácidos por ser menos propenso a

desenrollamiento en un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8 en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener remplazo de aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el remplazo de aminoácidos por ser menos propenso a desenrollamiento a aproximadamente pH neutro en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.

Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes adecuadas pueden tener también uno o más remplazos de aminoácidos en la hélice α cerca del sitio activo ($\alpha 6$) de la proteína, caracterizado el uno o más remplazos de cadenas laterales de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que estabiliza esta hélice y extrae el bucle1 adyacente desde el sitio catalítico y tiene una conformación abierta y activa. Estas proteínas también pueden tener un remplazo de aminoácido A, V o N en la posición 321 en la hélice α cerca del sitio activo ($\alpha 6$) de la proteína, caracterizado el remplazo de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que estabiliza esta hélice y extrae el bucle1 adyacente desde el sitio catalítico y tiene una conformación abierta y activa que se caracteriza por ser más estable en un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8 en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden caracterizarse por tener una conformación más abierta a aproximadamente pH neutro en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener remplazo de aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el remplazo de aminoácidos por tener una conformación más abierta en un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8 en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener remplazo de aminoácidos A y F en las posiciones 316 y 317 en la región de bucle1 de la proteína, caracterizado el remplazo de aminoácidos por tener una conformación más abierta a aproximadamente pH neutro en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.

La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante adecuada también puede tener un remplazo de aminoácido L o F en la posición 145 en la región de enrollamiento aleatorio entre la lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$), caracterizado el remplazo de cadenas laterales de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que facilita mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad mejorada. Estas proteínas también pueden tener un remplazo de aminoácido L o F en la posición 145 en la región de enrollamiento aleatorio entre la lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$), caracterizado el remplazo de cadenas laterales de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que facilita mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad mejorada que se caracteriza por ser más estable en un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8 en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener un remplazo de aminoácido L o F en la posición 145 en la región de enrollamiento aleatorio entre la lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$), caracterizado el remplazo de cadenas laterales de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que facilita mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad mejorada a aproximadamente pH neutro en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener un remplazo de aminoácido L o F en la posición 145 en la región de enrollamiento aleatorio entre la lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$), caracterizado el remplazo de cadenas laterales de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que facilita mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad mejorada en un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8 en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Estas proteínas también pueden tener un remplazo de aminoácido L o F en la posición 145 en la región de enrollamiento aleatorio entre la lámina beta ($\beta 2$) y una hélice α ($\alpha 2$), caracterizado el remplazo de cadenas laterales de aminoácidos por tener una conformación de cadena lateral que facilita mejores interacciones entre diferentes restos y estructuras secundarias para una estabilidad mejorada a aproximadamente pH neutro en comparación con la proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.

Los métodos para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico también pueden incluir la administración, a un sujeto que lo necesita, de una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante que tiene una mutación seleccionada de:

F316A y L317F;

H145L;

H145F;

H145L, F316A y L317F;

K321A; y

K321V;

respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes variantes que comprenden la mutación F316A y L317F o H145L; pueden comprender adicionalmente una mutación seleccionada de K321N, K321A y K321V, donde las mutaciones son respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Los métodos para tratar la enfermedad de almacenamiento lisosómico también pueden incluir métodos para tratar la enfermedad de Gaucher. Los métodos de tratamiento pueden ser por infusión intravenosa, por inyección

intramuscular o por otras vías de administración conocidas para los expertos en la materia.

Los compuestos adecuados pueden tener una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. Los compuestos adecuados pueden tener una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes adecuadas también pueden caracterizarse como capaces de una expresión aumentada respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La expresión proteica de la β -glucocerebrosidasa recombinante, variante también puede aumentarse en al menos aproximadamente un 10% respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La expresión proteica de la β -glucocerebrosidasa recombinante, variante también puede aumentarse en al menos aproximadamente un 25% respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La expresión proteica de la β -glucocerebrosidasa recombinante, variante también puede aumentarse en al menos aproximadamente un 50% respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. La expresión proteica de la β -glucocerebrosidasa recombinante, variante también puede aumentarse en al menos aproximadamente un 80% respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre. Las proteínas β -glucocerebrosidasa recombinantes, variantes también pueden ser capaces de expresarse en células de mamífero, animales transgénicos o en células de levadura. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante también puede expresarse en un ser humano. La proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante también puede expresarse a partir de un gen insertado.

Ejemplo 13

Las proteínas GlcCerasa recombinantes, variantes y GlcCerasa de tipo silvestre se expresaron en cultivo celular de acuerdo con métodos mencionados previamente para evaluar la expresión relativa de estas enzimas GlcCerasa variantes en comparación con la GlcCerasa de tipo silvestre. Varias enzimas GlcCerasa variantes diferentes se expresaron mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre en experimentos de transfección transitoria, medido por la actividad enzimática a partir del medio condicionado después de aproximadamente 48 horas después de la transfección (Figura 1). La GlcCerasa-F316A/L317A se expresó mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre (aproximadamente un 282%), la GlcCerasa-K321N se expresó mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre (aproximadamente un 272%), la GlcCerasa-H145L se expresó mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre (aproximadamente un 157%), la GlcCerasa-F316A/L317A/K321N se expresó mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre (aproximadamente un 272%), la GlcCerasa-H145L/K321N se expresó mejor que la GlcCerasa de tipo silvestre (aproximadamente un 317%). La GlcCerasa-K321A se expresó de forma equivalente a la GlcCerasa de tipo silvestre mientras que la GlcCerasa-K321V se expresó a niveles inferiores que el tipo silvestre (aproximadamente un 61%) (datos no mostrados).

También se proporcionan en este documento métodos para preparar un compuesto que comprende una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. También se proporcionan en este documento métodos para preparar un ácido nucleico que codifica una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante caracterizada por tener una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16.

Ejemplo 14

Construcción de plásmidos para enzimas GlcCerasa de tipo silvestre y modificadas

Se generaron plásmidos de ADN para la expresión de enzimas GlcCerasa de tipo silvestre y modificadas usando cebadores oligonucleotídicos (enumerados en la Tabla 3) o minigenes de ADN sintético (>400 pb) que codifican un fragmento de GlcCerasa con sustituciones específicas de aminoácidos. Todos los cebadores y minigenes de ADN sintético se adquirieron de Integrated DNA Technologies™ (Coralville, IA). La GlcCerasa humana de tipo silvestre (denominada como pH101) se construyó por generación del ADNc de GlcCerasa por PCR y ligamiento en un vector de expresión de mamífero. En resumen, se amplificó el ADNc completo de GlcCerasa humana de tipo silvestre con su secuencia Kozak y codón de parada natural usando los cebadores A y B y el ADN molde del clon de ADNc de GlcCerasa humana (Origene™) en dos reacciones idénticas de 50 μ l mediante la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion-HF™ (NEB™) y dNTP 200 μ M. El cebador A se construyó para que contuviera un sitio de restricción BglII 5' y un sitio de restricción EcoRI interno que precedía inmediatamente la secuencia Kozak, mientras que el cebador B contenía sitios de restricción NheI y NotI 3' que seguían al codón de parada para posibilitar la

clonación del producto de PCR en los vectores de expresión. Las reacciones de PCR se combinaron y el producto resultante de PCR de ~1,6 kilobases (kb) se separó y se escindió de un gel preparativo de agarosa al 1% (p/v) y se aisló usando el kit de extracción de gel de QIAGEN™. El producto de PCR se digirió posteriormente durante una noche con las endonucleasas de restricción BglII y NotI a 37°C y se volvió a purificar usando el kit de limpieza de PCR de QIAGEN™ según las instrucciones del fabricante. El vector de expresión en mamífero pEF6/V5-HisA™ se digirió con BamHI y NotI, se desfosforiló usando fosfatasa Antarctic™ y se aisló usando el kit de limpieza de PCR de QIAGEN™. El producto de PCR digerido con BglII-NotI (2 µl) se ligó en el vector BamHI-NotI pEF6/V5-HisA™ (1 µl) usando ADN ligasa T4 (NEB™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transformaron células de *E. coli* químicamente competentes con 1 µl de la reacción de ligamiento y se sembraron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C para formar distintas colonias bacterianas que se habían transformado con el ADN plasmídico que contenía el gen de la β-lactamasa para conferir resistencia a ampicilina. Se picaron colonias bacterianas individuales resistentes a ampicilina y se expandieron en 4 ml de caldo LB (que contenía 100 µg/ml de ampicilina) durante una noche a 37°C y se aisló el ADN plasmídico el siguiente día por Miniprep™ (QIAGEN™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ADN plasmídicos aislados se comprobaron mediante dos reacciones diferentes de digestión de restricción usando EcoRI y NheI, y BamHI, respectivamente. Se eligió un ADN plasmídico correcto del clon 4 (denominado como pHD101.4) y se usó para volver a transformar células de *E. coli* competentes como se ha descrito anteriormente para una replicación de alto nivel del ADN plasmídico. Entonces se picó una colonia de la placa de agar LB-ampicilina y se cultivó en 200 ml de caldo LB durante una noche a 37°C y se aisló el plásmido pHD101.4 por Maxiprep™ (Promega™). El plásmido pHD101.4 (que codifica el ADNc de GlcCerasa humana de tipo silvestre) se verificó por secuenciación de ADN y se usó para la construcción de otras enzimas GlcCerasa y para experimentos de transfección transitoria.

Se incorporó un sitio de restricción BglII en el cebador 1 de modo que el ligamiento del producto de PCR de GlcCerasa digerido con BglII en el sitio BamHI compatible del vector pEF6/V5-HisA™ eliminara el sitio de restricción BamHI dentro del sitio de clonación múltiple y este vector de expresión modificado se mencionará como pEF6' a partir de ahora. La eliminación de este sitio BamHI dentro pEF6/V5-HisA™ era necesaria de modo que pueda utilizarse un sitio BamHI único dentro del ADNc de GlcCerasa para insertar fragmentos de ADN con sustituciones específicas de nucleótidos para generar enzimas GlcCerasa modificadas.

Para generar GlcCerasa-F316A/L317F (denominada como pHD105), se sintetizó un minigén de GlcCerasa que contenía estas sustituciones de aminoácidos por Integrated DNA Technologies™ entre sitios de restricción BsrGI 5' y BamHI 3' flanqueantes naturales. El fragmento de ADN de GlcCerasa modificado sintético (~0,5 kb) se liberó del plásmido pIDTSMART™ por digestión de restricción con BsrGI y BamHI y se aisló posteriormente por gel preparativo de agarosa al 1% y se ligó en fase en pHD101.4 que se había digerido previamente con BsrGI y BamHI y desfosforilado. Se usó un microlitro de esta reacción de ligamiento para transformar células de *E. coli* competentes y la muestra se procesó como se ha descrito anteriormente para pHD101. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 5 (denominado como pHD105.5) se eligió, se verificó por secuenciación de ADN y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-K321N (denominada como pHD109), la sustitución de aminoácidos se introdujo por PCR solapante. En resumen, el fragmento N-terminal (~1,1 kb) se generó usando los cebadores A y D, y pHD101.4 como ADN molde en la reacción de PCR 1 mientras el fragmento C-terminal (~0,5 kb) se generó usando los cebadores B y C, y pHD101.4 como molde en la reacción de PCR 2. Después se sintetizó el ADNc completo de la K321N GlcCerasa en la reacción de PCR 3 añadiendo 1 µl de las reacciones de PCR A y B y los cebadores 1 y 2. El producto de PCR resultante 3 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 3 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado y se procesó como se ha descrito anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 3 (denominado como pHD109.3) se eligió, se verificó por secuenciación de ADN y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-H145L (denominada como pHD110), la sustitución de aminoácidos se introdujo por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~0,55 kb) se generó usando los cebadores A y F y, pHD101.4 como ADN molde en la reacción de PCR 4 mientras el fragmento C-terminal (~1 kb) se generó usando los cebadores B y E, y pHD101.4 como molde en la reacción de PCR 5. El ADNc completo de H145L GlcCerasa se generó en la reacción de PCR 6 añadiendo 1 µl de las reacciones de PCR 4 y 5 y los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 6 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 6 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado y se procesó como anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 2 (denominado como pHD110.2) se eligió, se verificó por secuenciación de ADN y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-H145F (denominada como pHD111), la sustitución de aminoácidos se introdujo por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~0,55 kb) se generó usando los cebadores A y H, y pHD101.4 como ADN molde en la reacción de PCR 7 mientras el fragmento C-terminal (~1 kb) se generó usando los cebadores B y G, y pHD101.4 como molde en la reacción de PCR 8. El ADNc completo de H145L GlcCerasa se generó en la reacción de PCR 9 añadiendo 1 µl de las reacciones de PCR 7 y 8 y los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 9

(~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 9 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado y se procesó como anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 1 (denominado como pHD111.1) se eligió, se verificó por secuenciación de ADN y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-F316A/L317F/K321N (denominada como pHD112), la sustitución de aminoácidos se introdujo en pHD105.5 por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~1,1 kb) se generó usando los cebadores A y D, y pHD105.5 como ADN molde en la reacción de PCR 10 mientras el fragmento C-terminal (~0,5 kb) se generó usando los cebadores B y C, y pHD105.5 como molde en la reacción de PCR 11. El ADNc completo de F316A/L317F/K321N GlcCerasa se generó en la reacción de PCR 12 añadiendo 1 µl de las reacciones de PCR 10 y 11 y los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 12 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 12 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado como se ha descrito anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción usando EcoRI y XbaI. El clon 7 (denominado como pHD112.7) se eligió, se verificó por secuenciación de ADN y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-H145L/F316A/L317F (denominada como pHD113), la sustitución de aminoácidos se introdujo en pHD105.5 por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~0,55 kb) se generó usando los cebadores A y F, y pHD105.5 como ADN molde en la reacción de PCR 13 mientras el fragmento C-terminal (~1 kb) se generó usando los cebadores B y E, y pHD105.5 como molde en la reacción de PCR 14. El ADNc completo de H145L/F316A/L317F GlcCerasa se generó en la reacción de PCR 15 añadiendo 1 µl de las reacciones de PCR 13 y 14 y los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 15 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 15 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado como se ha descrito previamente.

Para generar GlcCerasa-H145F/F316A/L317F (denominada como pHD114), la sustitución de aminoácidos se introdujo en pHD105.5 por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~0,55 kb) se generó usando los cebadores A y H, y pHD105.5 como ADN molde en la reacción de PCR 16 mientras el fragmento C-terminal (~1 kb) se generó usando los cebadores B y G, y pHD105.5 como molde en la reacción de PCR 17. El ADNc completo de H145F/F316A/L317F GlcCerasa se generó en la reacción de PCR 18 añadiendo 1 µl de las reacciones de PCR 16 y 17 y los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 18 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 18 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado como se ha descrito previamente.

Para generar GlcCerasa-H145L/K321N (denominada como pHD115), se digirieron tanto pHD109.3 como pHD110.2 con las enzimas de restricción BsrGI y BamHI y el fragmento de ~0,5 kb de pHD109.3 y el fragmento de ~6,9 kb de pHD110.2 (después del tratamiento con fosfatasa Antarctic) se aislaron por gel preparativo de agarosa al 1%. El fragmento de ~0,5 kb de pHD109.3 (que contenía la sustitución de aminoácido K321N) después se ligó en fase en el plásmido pHD110.2 (contiene la modificación H145L) y se procesó como anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 5 se eligió, se verificó por secuenciación de ADN y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-H145L/F316A/L317F/K321N (denominada como pHD116), se digerirán tanto pHD112.7 como pHD110.2 con las enzimas de restricción BsrGI y BamHI y el fragmento de ~0,5 kb de pHD112.7 y el fragmento de ~6,9 kb de pHD110.2 (después del tratamiento con fosfatasa Antarctic™) se aislarán por gel preparativo de agarosa al 1%. El fragmento de ~0,5 kb de pHD112.7 (que contiene las sustituciones de aminoácidos F316A/L317F/K321N) se ligará en fase en el plásmido pHD110.2 (contiene la modificación H145L) y se procesará como anteriormente. Se aislará ADN Miniprep de clones individuales y se ensayará por digestión de restricción con EcoRI y XbaI para identificar la cepa bacteriana transformada con el ADNc correcto de GlcCerasa-H145L/F316A/L317F/K321A. La construcción de ADN seleccionada se verificará por secuenciación de ADN y se usará para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-K321A (denominada como pHD117), la sustitución de aminoácidos se introdujo por PCR solapante. En resumen, el fragmento N-terminal (~1,1 kb) se generó usando los cebadores A y J, y pHD101.4 como ADN molde en la reacción de PCR 19 mientras el fragmento C-terminal (~0,5 kb) se generó usando los cebadores B e I, y pHD101.4 como molde en la reacción de PCR 20. Los productos de PCR 19 y 20 se aislaron por gel preparativo de agarosa al 1% y se usaron como ADN molde para sintetizar el fragmento de ADNc completo de K321A GlcCerasa en la reacción de PCR 21 usando los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 21 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 21 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado y se procesó como se ha descrito anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 1 (denominado como pHD117.1) se eligió y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-K321V (denominada como pHD118), la sustitución de aminoácidos se introdujo por PCR solapante. En resumen, el fragmento N-terminal (~1,1 kb) se generó usando los cebadores A y L, y pHD101.4 como ADN molde en la reacción de PCR 22 mientras el fragmento C-terminal (~0,5 kb) se generó usando los cebadores B y K, y pHD101.4 como molde en la reacción de PCR 23. Los productos de PCR 22 y 23 se aislaron por gel preparativo de agarosa al 1% y se usaron como ADN molde para sintetizar el fragmento de ADNc completo de K321A GlcCerasa en la reacción de PCR 24 usando los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 24 (~1,6 kb) se aisló de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 24 se volvió a purificar y se ligó en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado y se procesó como se ha descrito anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI. El clon 7 (denominado como pHD118.7) se eligió y se usó para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-F316A/L317F/K321A (denominada como pHD119), la sustitución de aminoácidos se introducirá en pHD105.5 por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~1,1 kb) se generará usando los cebadores A y J, y pHD105.5 como ADN molde en la reacción de PCR 25 mientras el fragmento C-terminal (~0,5 kb) se generará usando los cebadores B e I, y pHD105.5 como molde en la reacción de PCR 26. Los productos de PCR 25 y 26 se aislarán por gel preparativo de agarosa al 1% y se usarán como ADN molde para sintetizar el fragmento de ADNc completo de F316A/L317F/K321A/K321A GlcCerasa en la reacción de PCR 27 usando los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 27 (~1,6 kb) se aislará de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirá con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 27 se volverá a purificar y se ligará en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado como se ha descrito anteriormente. Se aislará ADN Miniprep de clones individuales y se ensayará por digestión de restricción usando EcoRI y XbaI para identificar la cepa bacteriana transformada con el ADNc correcto de GlcCerasa-F316A/L317F/K321A. La construcción de ADN seleccionada se verificará por secuenciación de ADN y se usará para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-F316A/L317F/K321V (denominada como pHD120), la sustitución de aminoácidos se introducirá en pHD105.5 por PCR solapante. El fragmento N-terminal (~1,1 kb) se generará usando los cebadores A y L, y pHD105.5 como ADN molde en la reacción de PCR 28 mientras el fragmento C-terminal (~ 0,5 kb) se generará usando los cebadores B y K, y pHD105.5 como molde en la reacción de PCR 29. Los productos de PCR 28 y 29 se aislarán por gel preparativo de agarosa al 1% y se usarán como ADN molde para sintetizar el fragmento de ADNc completo de F316A/L317F/K321A/K321V GlcCerasa en la reacción de PCR 30 usando los cebadores A y B. El producto de PCR resultante 30 (~1,6 kb) se aislará de un gel preparativo de agarosa al 1% como anteriormente y se digirá con endonucleasas de restricción EcoRI y NotI. El producto de PCR 30 se volverá a purificar y se ligará en el vector pEF6' digerido con EcoRI/NotI y desfosforilado como se ha descrito anteriormente. Se aislará ADN Miniprep de clones individuales y se ensayará por digestión de restricción usando EcoRI y XbaI para identificar la cepa bacteriana transformada con el ADNc correcto de GlcCerasa-F316A/L317F/K321V. La construcción de ADN seleccionada se verificará por secuenciación de ADN y se usará para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-H145L/K321A (denominada como pHD121), se digirán tanto pHD117.1 y pHD110.2 con las enzimas de restricción BsrGI y BamHI y el fragmento de ~0,5 kb de pHD117.1 y el fragmento de ~6,9 kb de pHD110.2 (después del tratamiento con fosfatasa Antarctic™) se aislarán por gel preparativo de agarosa al 1%. El fragmento de ~0,5 kb de pHD117.1 (que contiene la sustitución de aminoácido K321A) se ligará en fase en el plásmido pHD110.2 (contiene la modificación H145L) y se procesará como anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI para identificar la cepa bacteriana transformada con el ADNc correcto de GlcCerasa-H145L/K321A. La construcción de ADN seleccionada se verificará por secuenciación de ADN y se usará para caracterización adicional.

Para generar GlcCerasa-H145L/K321V (denominada como pHD122), se digirán tanto pHD118.7 como pHD110.2 con las enzimas de restricción BsrGI y BamHI y el fragmento de ~0,5 kb de pHD118.7 y el fragmento de ~6,9 kb de pHD110.2 (después del tratamiento con fosfatasa Antarctic) se aislarán por gel preparativo de agarosa al 1%. El fragmento de ~0,5 kb de pHD118.7 (que contiene la sustitución de aminoácido K321V) se ligará en fase en el plásmido pHD110.2 (contiene la modificación H145L) y se procesará como anteriormente. Se aisló ADN Miniprep de clones individuales y se ensayó por digestión de restricción con EcoRI y XbaI para identificar la cepa bacteriana transformada con el ADNc correcto de GlcCerasa-H145L/K321V. La construcción de ADN seleccionada se verificará por secuenciación de ADN y se usará para caracterización adicional.

La Tabla 3 resume las secuencias de cebadores mencionadas anteriormente para construir las enzimas GlcCerasa modificadas.

Tabla 3

SEQ ID NO:	Cebador	Hebra	Secuencia oligonucleotídica (5'->3')
25	A	+	ggcaagatctgaattcgggatggagtttcaagtccctccagag
26	B	-	tcgagcggcgcgaagctagcttatcactggcgacgccacaggtag
27	C	+	tccagccaacgccaccctag
28	D	-	ctagggtggcgttggctgga

29	E	+	tgattccagttgtgaactcagcctc
30	F	-	gaggctgaagttcaacaactggaatca
31	G	+	tgattccagttgtcaactcagcctc
32	H	-	gaggctgaagttgaacaactggaatca
33	I	+	tccagccgcagccacccctag
34	J	-	ctagggctggctgaggctgga
35	K	+	tccagccgtagccaccctag
36	L	-	cctagggctggctacggctgga

Aunque la presente invención se ha descrito en relación a realizaciones particulares de la misma, muchas otras variaciones y modificaciones y otros usos son evidentes para los expertos en la materia. Se prefiere, por lo tanto, que la presente invención esté delimitada no por la descripción específica de este documento, sino solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Secuencias

SEQ ID NO: 1

ARPCIPKSFYSSVVCV CNATYCD SFD PPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
 QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGF GGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
 EEGIGYNIIRVPMASCD FSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
 AQRPV SLLASPWTSPTWLKTNGAVNGK GSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
 AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPTLANSTHH
 NVRLMLDDQRLLLP HWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLD FLAPAKATLGE
 THRLFNTMLFA SEACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSITNLLYHVVGWT
 DWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
 GLVASQKNDLDA VALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISPGYSI
 HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 2

ARPCIPKSFYSSVVCV CNATYCD SFD PPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
 QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGF GGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
 EEGIGYNIIRVPMASCD FSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
 AQRPV SLLASPWTSPTWLKTNGAVNGK GSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
 AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPTLANSTHH
 NVRLMLDDQRLLLP HWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLD AFAPAKATLGE
 THRLFNTMLFA SEACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSITNLLYHVVGWT
 DWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
 GLVASQKNDLDA VALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISPGYSI
 HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 3

ARPCIPKSFYSSVVCV CNATYCD SFD PPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
 QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGF GGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
 EEGIGYNIIRVPMASCD FSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
 AQRPV SLLASPWTSPTWLKTNGAVNGK GSLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
 AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPTLANSTHH
 NVRLMLDDQRLLLP HWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLD FLAPANATLGE
 THRLFNTMLFA SEACVGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSITNLLYHVVGWT
 DWNLALNPEG GPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
 GLVASQKNDLDA VALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISPGYSI
 HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 4

ARPCIPKSFYSSVVCVFNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 5

ARPCIPKSFYSSVVCVFNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

5

SEQ ID NO: 6

ARPCIPKSFYSSVVCVFNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAFAPANATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

10

SEQ ID NO: 7

ARPCIPKSFYSSVVCVFNATYCDSDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAFAPAKATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

15

SEQ ID NO: 8

ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCFDSIRTYTYADTPDDFQLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDAAFAPAKATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 9

ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCFDSIRTYTYADTPDDFQLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPANATLGE
5 THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 10

ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCFDSIRTYTYADTPDDFQLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDAAFAPANATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
10 GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 11

ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCFDSIRTYTYADTPDDFQLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAAATLGE
THRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
15 GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 12

ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRVPSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAVATLGE
THRLFNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 13

5 ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRVPSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAFAPAAATLGE
THRLFNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 14

10 ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRVPSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAFAPAVATLGE
THRLFNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 15

15 ARPCIPKSFYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRVPSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAAAATLGE
THRLFNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

SEQ ID NO: 16

ARPCIPKSFYSSVVCVFNATYCDSDPPTFPALGTFSTRSRRMELSMGPI
QANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFS
EEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLLNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQL
AQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAY
AEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHH
NVRLLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAVATLGE
THRLFNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSITNLLYHVVGWT
DWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRV
GLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSI
HTYLWRRQ

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> DO, Hung
- 5 <120> Proteínas beta-glucocerebrosidasa recombinantes, variantes con estabilidad aumentada y actividad catalítica retenida aumentada
 <130> CALL-0013
- 10 <150> US 61/411.331
 <151> 08-11-2010
 <160> 36
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 497
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería
- 25 <400> 1
- Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15
- Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30
- Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45
- Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60
- Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80
- Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95
- Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110
- Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125
- Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140
- His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu

ES 2 604 490 T3

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 2

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 2

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu

ES 2 604 490 T3

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 3

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 3

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly

ES 2 604 490 T3

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
305 310 315 320

Asn Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
485 490 495

Gln

<210> 4

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 4

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys

ES 2 604 490 T3

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 5

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

10

<400> 5

ES 2 604 490 T3

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140

Phe Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205

ES 2 604 490 T3

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

ES 2 604 490 T3

<210> 6
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 6

10

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160

ES 2 604 490 T3

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala
305 310 315 320

Asn Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
405 410 415

ES 2 604 490 T3

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 7

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 7

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

ES 2 604 490 T3

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
130 135 140

Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala
305 310 315 320

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
355 360 365

ES 2 604 490 T3

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 8

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 8

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

ES 2 604 490 T3

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80
 Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95
 Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110
 Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125
 Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140
 Phe Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160
 Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175
 Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190
 Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205
 Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220
 Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240
 Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255
 Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270
 His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285
 Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300
 Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala
 305 310 315 320

ES 2 604 490 T3

Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 9

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 9

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

ES 2 604 490 T3

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140

Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

ES 2 604 490 T3

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Asn Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 10

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

10

<400> 10

ES 2 604 490 T3

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140

Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220

ES 2 604 490 T3

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Asn Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

- 5 <210> 11
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 604 490 T3

<220>

<223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

5 <400> 11

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

ES 2 604 490 T3

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

ES 2 604 490 T3

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 12

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 12

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

ES 2 604 490 T3

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
305 310 315 320

Val Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
370 375 380

ES 2 604 490 T3

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
485 490 495

Gln

<210> 13

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 13

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
65 70 75 80

ES 2 604 490 T3

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95
 Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110
 Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125
 Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140
 His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160
 Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175
 Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190
 Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205
 Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220
 Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240
 Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255
 Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270
 His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285
 Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300
 Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

ES 2 604 490 T3

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 14

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 14

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

ES 2 604 490 T3

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140

His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

ES 2 604 490 T3

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Ala Phe Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Val Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

<210> 15

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

10

<400> 15

ES 2 604 490 T3

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
130 135 140

Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
180 185 190

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
225 230 235 240

ES 2 604 490 T3

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
 435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

- 5 <210> 16
- <211> 497
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 604 490 T3

<220>

<223> Organismo fuente humano, pero con mutación diseñada por ingeniería

<400> 16

5

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
 1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
 20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
 35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
 85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
 100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
 115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu
 130 135 140

Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala
 165 170 175

Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn
 180 185 190

ES 2 604 490 T3

Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr
 195 200 205

Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys
 210 215 220

Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln
 245 250 255

Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr
 260 265 270

His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu
 275 280 285

Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr
 290 295 300

Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Val Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu
 325 330 335

Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val
 340 345 350

Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile
 355 360 365

Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala
 370 375 380

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
 385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
 405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
 420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala

ES 2 604 490 T3

435

440

445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
 450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
 465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
 485 490 495

Gln

5 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

10 Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr
 1 5 10 15

15 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> S. scrofa
 <400> 18

20 Asp Asp Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Val
 1 5 10 15

25 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> B. taurus
 <400> 19

30 Asp Asp Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Val
 1 5 10 15

35 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Especie murina
 <400> 20

40 Asn Asp Phe Gln Leu Ser Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr
 1 5 10 15

45 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

ES 2 604 490 T3

Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> S. scrofa
 <400> 22
 Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr
 10 1 5 10
 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> B. taurus
 <400> 23
 Asp Phe Leu Ala Pro Ala Asn Ala Thr Leu Gly Glu Thr
 20 1 5 10
 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Especie murina
 25 <400> 24
 Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr
 1 5 10
 30 <210> 25
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 25
 40 ggcaagatct gaattcgga tggagtttc aagtcctcc agag 44
 <210> 26
 <211> 45
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 50 <400> 26
 tcgagcggcc gcaagctagc ttactactgg cgacgccaca ggtag 45
 <210> 27
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador sintético
 <400> 27

tccagccaac gccaccctag 20

5 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 28

15 ctaggtggc gttggctga 20

<210> 29
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 29

25 tgattccag ttgtgaact tcagcctc 28

<210> 30
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador sintético

35 <400> 30

gaggctgaag ttcaacaact ggaaatca 28

40 <210> 31
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 31

50 tgattccag ttgtcaact tcagcctc 28

<210> 32
 <211> 28
 <212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

60 <400> 32

gaggctgaag tgaacaact ggaaatca 28

65 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 5 <400> 33
 tccagccgca gccaccctag 20
 10 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 34
 20 ctagggtggt gcggctgga 19
 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 30 <400> 35
 tccagccgta gccaccctag g 21
 <210> 36
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador sintético
 <400> 36
 45 cctagggtgg ctacggctgg a 21

REIVINDICACIONES

1. Una proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante que tiene una mutación seleccionada de:
 5 F316A y L317F;
 H145L;
 H145F;
 H145L, F316A y L317F;
 K321A; y
 K321V;
 10 respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la mutación
 15 F316A y L317F; o
 H145L; y
 que comprende adicionalmente una mutación seleccionada de K321N, K321A y K321V, en la que las mutaciones son respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
3. Una proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 1 o
 20 reivindicación 2, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 16.
4. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con una cualquiera de las
 25 reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por tener estabilidad aumentada respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.
5. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la estabilidad aumentada es en condiciones fisiológicas.
- 30 6. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la estabilidad aumentada es en condiciones de pH neutro y 37°C.
7. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con una cualquiera de las
 35 reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por tener una semivida aparente prolongada al menos 2 veces más larga que la de β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.
8. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la semivida aparente prolongada se mide después de incubación en condiciones de pH neutro y 37°C sobre un periodo
 40 de tres horas.
9. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con una cualquiera de las
 reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por retener actividad catalítica aumentada respecto a la β -glucocerebrosidasa recombinante, de tipo silvestre.
- 45 10. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la actividad catalítica aumentada se mide después de incubación en condiciones de pH neutro y 37°C sobre un periodo de tres horas.
11. La proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de acuerdo con la reivindicación 9, en la que
 50 la actividad catalítica aumentada se retiene en condiciones fisiológicas.
12. Una composición que comprende la proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 13. Una composición que comprende la proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un tampón farmacéuticamente aceptable.
14. Una proteína β -glucocerebrosidasa recombinante, variante de acuerdo con una cualquiera de las
 60 reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.
15. Una proteína β -glucocerebrosidasa humana recombinante, variante para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Gaucher.

Expresión de enzimas GlcCerasa de tipo silvestre y variantes

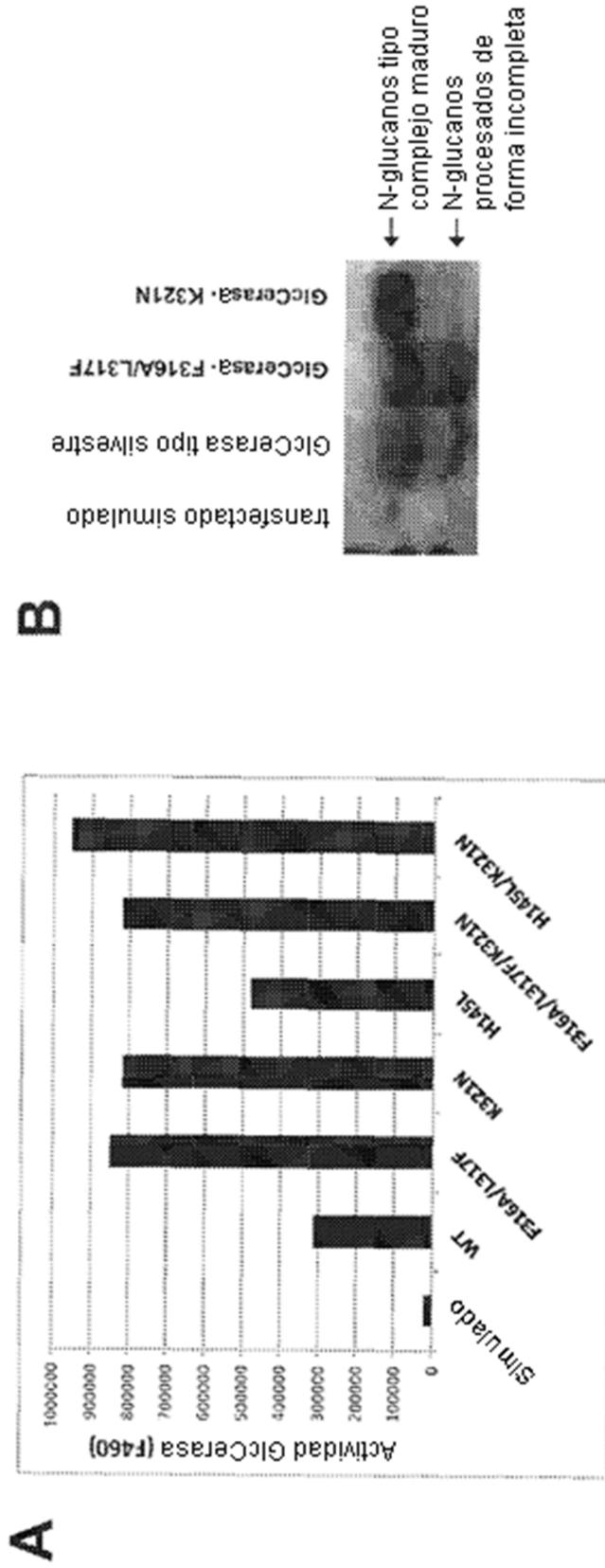


Figura 1

Estabilidad enzimas GlcCerasa a pH 7,5 y 37°C

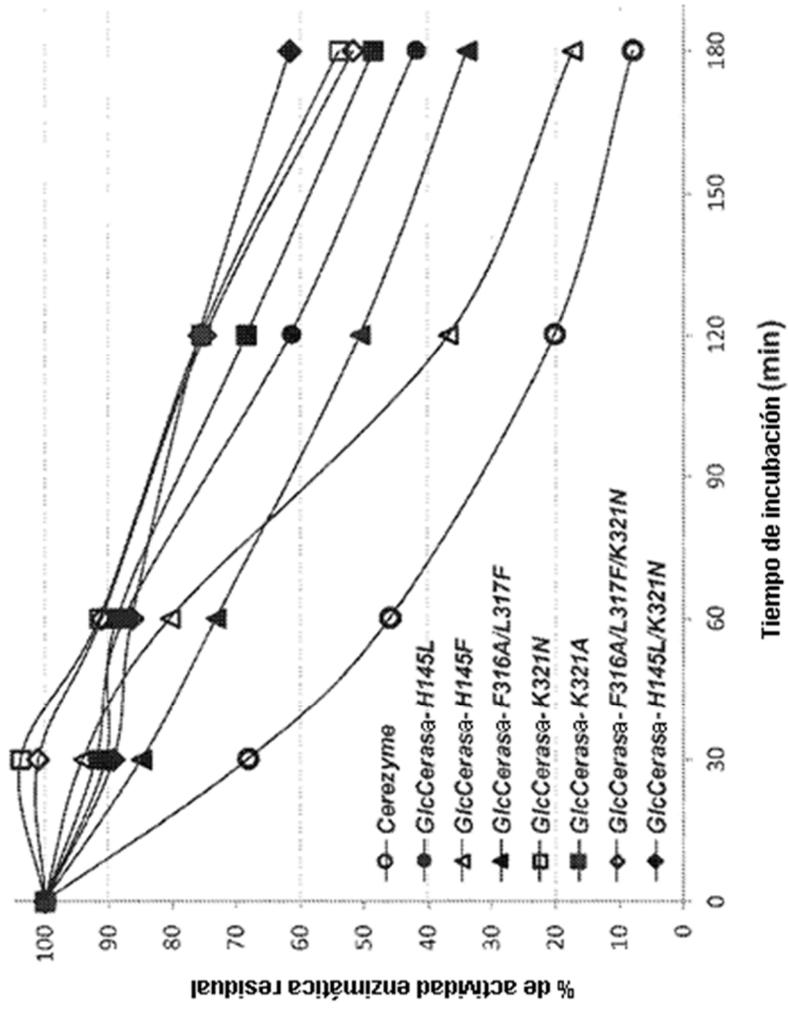


Figura 2

Estabilidad enzimas GlcCerasa a pH 8,0 y 37°C

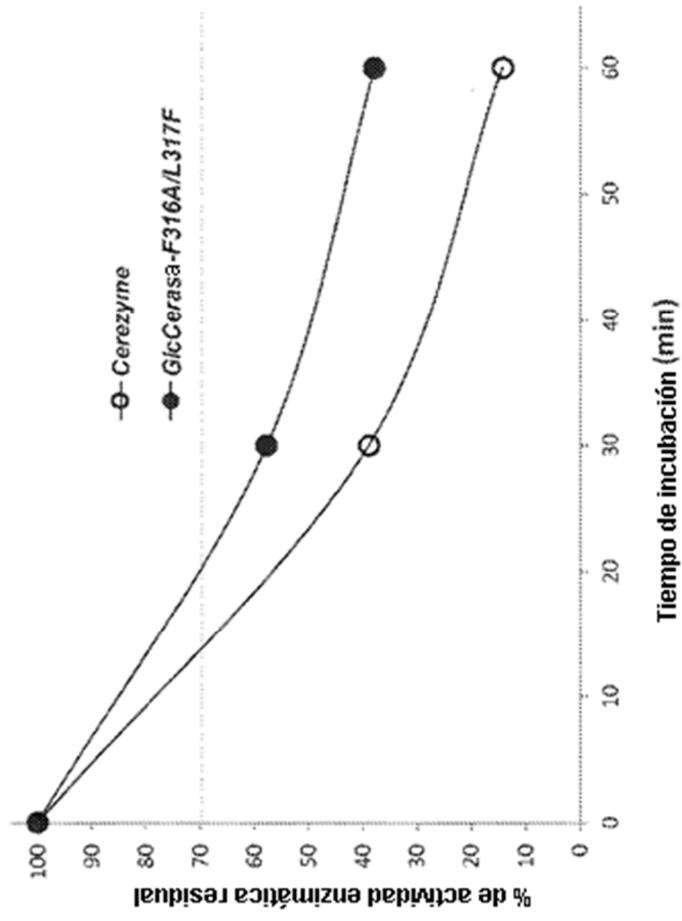


Figura 3