

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 317**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/61** (2006.01)  
**C12N 15/56** (2006.01)  
**C12N 9/40** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2000 E 10180768 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2314699**

54 Título: **Preparaciones médicas para el tratamiento de deficiencia de alfa-galactosidasa A**

30 Prioridad:

**11.03.1999 US 266014**

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

**27.09.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SELDEN, RICHARD F;  
BOROWSKI, MARIANNE;  
KINOSHITA, CAROL M;  
TRECO, DOUGLAS A;  
WILLIAMS, MELANIE D;  
SCHUETZ, THOMAS J y  
DANIEL, PETER FRANCIS**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 634 317 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).

**Preparaciones médicas para el tratamiento de deficiencia de alfa-galactosidasa A****DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de la deficiencia de  $\alpha$ -galactosidasa A.

**10 Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosomal hereditaria ligada al cromosoma X caracterizada por disfunción renal grave, angioqueratomas y anomalías cardiovasculares, incluyendo dilatación ventricular e insuficiencia de la válvula mitral. La enfermedad de Fabry también afecta al sistema nervioso periférico, provocando episodios de dolor angustioso, ardiente en las extremidades. La enfermedad de Fabry está provocada por una deficiencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A). La  $\alpha$ -Gal A es la glicohidrolasa lisosomal que escinde los restos  $\alpha$ -galactosilo terminales de diversos glicoconjugados. La enfermedad de Fabry da como resultado un bloqueo del catabolismo del glicoesfingolípido neutro, trihexósido de ceramida (CTH) y la acumulación de este sustrato enzimático dentro de las células y en el torrente sanguíneo.

Debido al patrón de herencia ligada al cromosoma X de la enfermedad, la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Fabry son hombres. Aunque se han observado mujeres heterocigóticas gravemente afectadas, las mujeres heterocigóticas son a menudo asintomáticas o tienen síntomas relativamente leves (tales como una opacidad característica de la córnea). Una variante atípica de la enfermedad de Fabry, que muestra baja actividad residual de la  $\alpha$ -Gal A y o bien síntomas muy leves o bien aparentemente ningún otro síntoma característico de la enfermedad de Fabry, se correlaciona con la hipertrofia ventricular izquierda y enfermedad cardíaca. Nakano *et al.*, New Engl. J. Med. 333: 288-293 (1995). Una reducción en la  $\alpha$ -Gal A puede ser la causa de tales anomalías cardíacas.

El ADNc y el gen que codifica para la  $\alpha$ -Gal A humana se han aislado y secuenciado. La  $\alpha$ -Gal A humana se expresa como un polipéptido de 429 aminoácidos, de los cuales los 31 aminoácidos N-terminales son el péptido señal. La enzima humana se ha expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) (Desnick *et al.*, patente estadounidense 5.356.804; Ioannou *et al.*, J. Cell Biol. 119: 1137 (1992)); y células de insecto (Calhoun *et al.*, documento WO 90/11353).

Sin embargo, las preparaciones actuales de  $\alpha$ -Gal A tienen eficacia limitada. La  $\alpha$ -Gal A producida por los procedimientos del estado de la técnica es eliminada rápidamente por el hígado.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A con una semivida en circulación aumentada y captación aumentada en tejidos específicos diferentes del hígado.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

La invención proporciona preparaciones de  $\alpha$ -Gal A con carga alterada. Las alteraciones de carga se logran aumentando el contenido de ácido siálico de  $\alpha$ -Gal A y/o aumentando la fosforilación de  $\alpha$ -Gal A.

Las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A de la presente invención son útiles para el tratamiento de individuos con enfermedad de Fabry o variantes atípicas de la enfermedad de Fabry, por ejemplo, poblaciones específicas de pacientes de Fabry con anomalías predominantemente cardiovasculares, como agrandamiento ventricular, por ejemplo, hipertrofia ventricular izquierda (LVH), y/o insuficiencia de la válvula mitral, o pacientes de Fabry con afectación predominantemente renal.

Específicamente, la invención se refiere a una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana que tiene una carga de oligosacáridos aumentada, en donde entre el 35% y el 85% de los oligosacáridos se cargan por la adición de :

- 55 (i) uno a cuatro residuos de ácido siálico en glicanos complejos,  
 (ii) uno a dos restos de fosfato en glicanos alta-manosa, o  
 (iii) un único fosfato y un único ácido siálico en glicanos híbridos,

60 para su uso en el tratamiento de deficiencia de  $\alpha$ -Gal A a una dosis semanal o bisemanal de entre 0,05 mg a 5,0 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kg de peso corporal de un sujeto.

**Breve descripción de los dibujos**

65 La figura 1 es una representación de la sonda de 210 pb que se usó para aislar un ADNc de  $\alpha$ -Gal A a partir de una biblioteca de ADNc de fibroblastos humanos (SEQ ID NO: 1). La secuencia es desde el exón 7 del

gen de  $\alpha$ -Gal A. La sonda se aisló a partir de ADN genómico humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las regiones subrayadas en la figura corresponden a las secuencias de los cebadores de amplificación.

5 La figura 2 es una representación de la secuencia del fragmento de ADN que completa el extremo 5' del clon de ADNc de  $\alpha$ -Gal A (SEQ ID NO: 2). Este fragmento se amplificó a partir de ADN genómico humano mediante PCR. Las regiones subrayadas corresponden a las secuencias de los cebadores de amplificación. También se muestran las posiciones de los sitios de endonucleasas de restricción NcoI y SacII, que se usaron para la subclonación tal como se describe en el ejemplo 1.

10 La figura 3 es una representación de la secuencia de ADNc de  $\alpha$ -Gal A, incluyendo la secuencia que codifica para el péptido señal (SEQ ID NO: 3).

La figura 4 es un mapa esquemático de pXAG-16, un constructo de expresión de  $\alpha$ -Gal A que incluye el promotor de CMV (citomegalovirus), el exón 1 y el primer intrón, la secuencia que codifica para el péptido señal de hGH y el primer intrón, el ADNc de  $\alpha$ -Gal A (que carece de la secuencia del péptido señal de  $\alpha$ -Gal A) y la UTS en 3' de hGH. pcDNeo indica la posición del gen *neo* derivado del plásmido pcDNeo.

15 La figura 5 es un mapa esquemático de pXAG-28, un constructo de expresión de  $\alpha$ -Gal A que incluye el promotor I $\alpha$ 2 del colágeno y el primer exón, un intrón de  $\beta$ -actina, la secuencia que codifica para el péptido señal de hGH y el primer intrón, el ADNc de  $\alpha$ -Gal A (que carece de la secuencia de péptido señal de  $\alpha$ -Gal A) y la UTS en 3' de hGH. pcDNeo indica la posición del gen *neo* derivado del plásmido pcDNeo.

20 La figura 6 es una representación de la secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -Gal A humana (SEQ ID NO: 4).

La figura 7 es una representación de la secuencia de ADNc que codifica para la  $\alpha$ -Gal A humana (sin péptido señal) (SEQ ID NO 5).

La figura 8 es un cromatograma de la etapa de purificación de  $\alpha$ -Gal A usando resina de butil-Sepharose®. Se muestra la absorbancia a 280 nm (línea sencilla) y la actividad  $\alpha$ -Gal A (línea de puntos) de las fracciones seleccionadas.

25 La figura 9 es un mapa esquemático de pGA213C.

La figura 10 es una representación esquemática del constructo de selección como diana, pGA213C, y la recombinación homóloga con el locus de  $\alpha$ -galactosidasa A endógena. pGA213C se representa como secuencias de selección como diana alineadas por encima con secuencias correspondientes en el locus de  $\alpha$ -galactosidasa A del cromosoma X. Las posiciones relativas respecto al codón de iniciación de metionina, ATG, se indican mediante los números por encima de los mapas lineales. La unidad de activación que contiene las secuencias de dhfr murina, neo bacteriana y promotor de CMV/intrón de aldolasa se muestran por encima de la posición (-221) en la que se insertaron mediante clonación de ADN. Las secuencias que codifican para  $\alpha$ -galactosidasa A se indican mediante los recuadros oscurecidos. Las secuencias genómicas que no codifican para  $\alpha$ -galactosidasa A se indican mediante recuadros ligeramente rellenos. Las flechas grandes indican la dirección de la transcripción para los casetes de expresión de neo y dhfr. El corte y empalme del ARNm de GA-GAL tras la activación génica y selección como diana satisfactorias se indican mediante la línea segmentada por debajo del mapa del locus de  $\alpha$ -galactosidasa A activada (GA-GAL).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### 40 Introducción

La invención proporciona preparaciones de  $\alpha$ -Gal A que tienen  $\alpha$ -Gal A con carga alterada. Las preparaciones pueden incluir diferentes glicoformas de  $\alpha$ -Gal A. Las alteraciones de carga se logran aumentando el contenido de ácidos siálicos de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A y/o aumentando la fosforilación de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A. Específicamente, la invención se refiere a una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana que tiene una carga de oligosacáridos aumentada, en donde entre el 35% y el 85% de los oligosacáridos se cargan por la adición de:

- 50 (i) uno a cuatro residuos de ácido siálico en glicanos complejos,  
 (ii) uno a dos restos de fosfato en glicanos alta-manosa, o  
 (iii) un único fosfato y un único ácido siálico en glicanos híbridos,

55 para su uso en el tratamiento de deficiencia de  $\alpha$ -Gal A a una dosis semanal o bisemanal de entre 0,05 mg a 5,0 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kg de peso corporal de un sujeto.

60 El contenido en ácido siálico de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A puede aumentarse mediante (i) el aislamiento de las glicoformas de la  $\alpha$ -Gal A de peso molecular superior y/o sumamente cargadas durante o tras el procedimiento de purificación; (ii) la adición de residuos de ácido siálico usando células modificadas genéticamente (o bien mediante procedimientos de ingeniería genética convencionales o bien mediante activación génica) para expresar un gen o ADNc de la sialil transferasa; o (iii) la fermentación o crecimiento de células que expresan la enzima en un entorno con bajo contenido en amonio.

65 La fosforilación de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A se aumenta mediante (i) la adición de residuos de fosfato usando células modificadas genéticamente (o bien mediante procedimientos de ingeniería genética convencionales

o bien mediante activación génica) para expresar un gen o ADNc de la fosforil transferasa; o (ii) la adición de inhibidores de fosfatasa a las células cultivadas.

5 Usando los procedimientos, se obtienen preparaciones de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana, en las que entre el 35% y el 85% de los oligosacáridos están cargados. En una realización preferida, al menos el 35% de los oligosacáridos están cargados. En una realización más preferida, al menos el 50% de los oligosacáridos están cargados.

10 En una realización, se produce una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada que tiene una carga de oligosacáridos aumentada introduciendo en primer lugar un polinucleótido, que codifica para la GlcNAc transferasa III (GnT-III), en una célula de producción de  $\alpha$ -Gal A, o introduciendo una secuencia reguladora mediante recombinación homóloga que regula la expresión de un gen de GnT-III endógeno. Entonces se cultiva la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A en condiciones de cultivo que dan como resultado la expresión de  $\alpha$ -Gal A y GnT-III. La etapa final consiste en aislar la preparación de  $\alpha$ -Gal A con carga de oligosacáridos aumentada.

15 En una realización alternativa, se produce una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada que tiene una carga de oligosacáridos aumentada introduciendo en primer lugar un polinucleótido, que codifica para una sialil transferasa, en una célula de producción de  $\alpha$ -Gal A, o introduciendo una secuencia reguladora mediante recombinación homóloga que regula la expresión de un gen de sialil transferasa endógeno. Entonces se cultiva la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A en condiciones de cultivo que dan como resultado la expresión de  $\alpha$ -Gal A y la sialil transferasa. La etapa final consiste en aislar la preparación de  $\alpha$ -Gal A con carga de oligosacáridos aumentada. Las sialil transferasas preferidas incluyen una  $\alpha$ 2,3-sialil transferasa y una  $\alpha$ 2,6-sialil transferasa. En una realización preferida, este procedimiento incluye la etapa adicional de seleccionar las glicofomas de la  $\alpha$ -Gal A con tamaño aumentado o carga aumentada mediante fraccionamiento o purificación de la preparación.

20 En otra realización, se obtiene una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada con sialilación aumentada poniendo en contacto una célula de producción de  $\alpha$ -Gal A con un medio de cultivo que tiene una concentración de amonio inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM. En una realización preferida, se logra el entorno con bajo contenido en amonio mediante la adición de glutamina sintetasa al medio de cultivo. En una realización preferida alternativa, se logra el entorno con bajo contenido en amonio mediante perfusión continua o intermitente de la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A con medio de cultivo nuevo para mantener la concentración de amonio inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM.

25 En otra realización más, se obtiene una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada con fosforilación aumentada introduciendo en primer lugar en una célula de producción de  $\alpha$ -Gal A un polinucleótido que codifica para la fosforil transferasa, o introduciendo una secuencia reguladora mediante recombinación homóloga que regula la expresión de un gen de fosforil transferasa endógeno. Entonces se cultiva la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A en condiciones de cultivo que dan como resultado la expresión de  $\alpha$ -Gal A y fosforil transferasa. Entonces se aísla la preparación de  $\alpha$ -Gal A con fosforilación aumentada en comparación con la  $\alpha$ -Gal A producida en una célula sin el polinucleótido. En una realización preferida, las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A producidas mediante los procedimientos tienen múltiples glicofomas, estando entre el 16-50%, preferiblemente el 25-50%, más preferiblemente al menos el 30% de las glicofomas fosforiladas. En una realización preferida, este procedimiento incluye la etapa adicional de seleccionar las glicofomas de  $\alpha$ -Gal A con tamaño aumentado o carga aumentada mediante fraccionamiento o purificación de la preparación.

30 En otra realización más, se obtiene una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada con fosforilación aumentada añadiendo un inhibidor de fosfatasa, por ejemplo, bromotetramisol, a las células cultivadas. Pueden estar presentes niveles bajos de fosfatasa alcalina de plasma bovino en el suero de ternero fetal usado como aditivo de crecimiento para las células cultivadas. Esto eleva la posibilidad de que los epítomos de Man-6-P expuestos sobre la  $\alpha$ -Gal A secretada puedan ser un sustrato para la fosfatasa alcalina sérica. Se ha mostrado que el bromotetramisol es un potente inhibidor de la fosfatasa alcalina;  $K_i = 2,8$  mM (Metaye *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 15: 4263-4268 (1988)) y se logra inhibición completa a una concentración de 0,1 mM (Borgers & Thone, *Histochemistry* 44: 277-280 (1975)). Por tanto, puede añadirse un inhibidor de fosfatasa, por ejemplo, bromotetramisol, a las células cultivadas en una realización para maximizar la forma de captación alta de la  $\alpha$ -Gal A presente en el medio de cultivo impidiendo la hidrólisis de los grupos éster de Man-6-P.

35 En otra realización más, se obtiene una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada con fosforilación aumentada añadiendo un inhibidor de fosfatasa, por ejemplo, bromotetramisol, a las células cultivadas. Pueden estar presentes niveles bajos de fosfatasa alcalina de plasma bovino en el suero de ternero fetal usado como aditivo de crecimiento para las células cultivadas. Esto eleva la posibilidad de que los epítomos de Man-6-P expuestos sobre la  $\alpha$ -Gal A secretada puedan ser un sustrato para la fosfatasa alcalina sérica. Se ha mostrado que el bromotetramisol es un potente inhibidor de la fosfatasa alcalina;  $K_i = 2,8$  mM (Metaye *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 15: 4263-4268 (1988)) y se logra inhibición completa a una concentración de 0,1 mM (Borgers & Thone, *Histochemistry* 44: 277-280 (1975)). Por tanto, puede añadirse un inhibidor de fosfatasa, por ejemplo, bromotetramisol, a las células cultivadas en una realización para maximizar la forma de captación alta de la  $\alpha$ -Gal A presente en el medio de cultivo impidiendo la hidrólisis de los grupos éster de Man-6-P.

40 La sialilación mejorada de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A mejora la semivida en circulación de la  $\alpha$ -Gal A exógena. Además, la sialilación mejorada de la  $\alpha$ -Gal A mejora su captación, con respecto a la de los hepatocitos, en células que no son hepatocitos tales como células endoteliales hepáticas, células sinusoidales hepáticas, células pulmonares, células renales, células neurales, células endoteliales o células cardíacas.

45 La fosforilación de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A también mejora el nivel de  $\alpha$ -Gal A que entra en las células. La fosforilación se produce dentro de las células que expresan la  $\alpha$ -Gal A.

50 Los niveles de sialilación pueden variar dependiendo del tipo de célula usada. Por tanto, en otra realización

preferida, puede potenciarse la sialilación de  $\alpha$ -Gal A explorando para seleccionar células de mamífero, por ejemplo células humanas, que tienen actividad sialil transferasa relativamente alta y usando tales células como células de producción de  $\alpha$ -Gal A.

5 Las formulaciones de una preparación de  $\alpha$ -Gal A divulgadas en la presente están sustancialmente libres de proteínas que no son  $\alpha$ -Gal A, tales como albúmina, proteínas que no son  $\alpha$ -Gal A producidas por la célula huésped o proteínas aisladas del tejido o fluido animal. La formulación puede comprender además un excipiente. Los excipientes preferidos incluyen manitol, sorbitol, glicerol, aminoácidos, lípidos, EDTA, EGTA, cloruro de sodio, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, dextrano o combinaciones de cualquiera de estos excipientes. En otra realización, 10 la formulación comprende además un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos preferidos incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, Octil- $\alpha$ -glucósido, Octil- $\beta$ -glucósido, Brij 35, Pluronic y Tween 20. En una realización preferida, el detergente no iónico comprende Polisorbato 20 o Polisorbato 80. Una formulación preferida comprende además solución salina tamponada con fosfato, preferiblemente a pH 6.

15 La preparación de  $\alpha$ -Gal A es una preparación de  $\alpha$ -Gal A con carga alterada. La dosis de administración está entre 0,05-5,0 mg, más preferiblemente entre 0,1-0,3 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kilogramo de peso corporal semanal o quincenalmente. En una realización preferida, la dosis de administración es de aproximadamente 0,2 mg por kilogramo de peso corporal quincenalmente. En estos procedimientos, la dosis puede administrarse por vía intramuscular, por vía oral, por vía rectal, por vía subcutánea, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía 20 intracerebral, por vía intranasal, por vía intradérmica, por vía intratecal, por vía intramucosa, por vía transdérmica o mediante inhalación. En una realización, el procedimiento para administrar la preparación de  $\alpha$ -Gal A a un sujeto comprende administrar por vía subcutánea una dosis que oscila entre 0,01-10,0 mg, preferiblemente 0,1-5,0 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kg de peso corporal quincenal o semanalmente. La preparación de  $\alpha$ -Gal A también puede administrarse por vía intravenosa, por ejemplo en una inyección de bolo intravenoso, en una inyección 25 intravenosa de empuje lento o mediante inyección intravenosa continua. En cualquiera de los procedimientos anteriores, la preparación de  $\alpha$ -Gal A puede administrarse usando un sistema de administración tal como una administración con bomba, administración de células encapsuladas, administración liposomal, inyección administrada con aguja, inyección sin aguja, nebulizador, pulverizador, electroporación y parche transdérmico. Cualquiera de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A descritas anteriormente puede administrarse mediante estos 30 procedimientos.

Puede tratarse a un individuo que se sospecha que tiene, o se sabe que tiene la enfermedad de Fabry mediante la administración de la preparación de  $\alpha$ -Gal A descrita anteriormente, usando los procedimientos de administración y dosis descritos anteriormente. La presente invención contempla el tratamiento de individuos con 35 enfermedad de Fabry en general ("pacientes con Fabry"), así como variantes atípicas de la enfermedad de Fabry, por ejemplo, poblaciones específicas de pacientes con Fabry con anomalías predominantemente cardiovasculares, definidos en este caso como pacientes con Fabry con dilatación ventricular, por ejemplo, hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y/o insuficiencia de la válvula mitral, o pacientes con Fabry con afectación predominantemente renal.

#### 40 $\alpha$ -Gal A

La  $\alpha$ -Gal A es una glicoproteína homodimérica que hidroliza los restos  $\alpha$ -galactosilo terminales de glicolípidos y glicoproteínas

45 Los términos " $\alpha$ -Gal A" madura y "GA-GAL" y "SEQ ID NO: 5" (véase la figura 7) se refieren a  $\alpha$ -Gal A sin un péptido señal (para  $\alpha$ -Gal A con el péptido señal, véase la figura 3 y la SEQ ID NO: 3). La expresión "preparación de  $\alpha$ -Gal A", tal como se define en el presente documento, se usa de manera intercambiable con la expresión "preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada" y comprende diversas glicofomas de  $\alpha$ -Gal A glicosilada.

50 Un "péptido señal" es una secuencia peptídica que dirige un polipéptido recién sintetizado al que está fijado el péptido señal hacia el retículo endoplasmático (RE) para su procesamiento postraduccional adicional y distribución.

55 Un "péptido señal heterólogo", tal como se usa en el presente documento en el contexto de  $\alpha$ -Gal A, significa un péptido señal que no es el péptido señal de la  $\alpha$ -Gal A humana, normalmente el péptido señal de alguna proteína de mamífero diferente de  $\alpha$ -Gal A.

60 Los expertos reconocerán que la secuencia de ADN de  $\alpha$ -Gal A humana (o bien ADNc [SEQ ID NO: 5] o bien ADN genómico), o secuencias que difieren del ADN de  $\alpha$ -Gal A humana debido o bien a cambios silenciosos de codones o a cambios de codones que producen sustituciones de aminoácidos conservadoras, pueden usarse para modificar genéticamente células humanas cultivadas de modo que sobreexpresen y secreten la enzima. Ciertas mutaciones en la secuencia de ADN de  $\alpha$ -Gal A pueden codificar para polipéptidos que conservan o muestran actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A mejorada. Por ejemplo, podría esperarse que las sustituciones de aminoácidos conservadoras tengan poco o ningún efecto sobre la actividad biológica, particularmente si representan menos del 65 10% del número total de los residuos en la proteína. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente

sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.356.804.

## 5 Enfermedad de Fabry

La enfermedad de Fabry es un trastorno genético provocado por la actividad deficiente de la enzima  $\alpha$ -Gal A. Por "deficiencia de  $\alpha$ -Gal A", se quiere decir cualquier deficiencia de la cantidad o actividad de esta enzima en un paciente, que da como resultado acumulaciones anómalas de glicolípidos neutros (por ejemplo, globotriaosilceramida) en histiocitos de las paredes de los vasos sanguíneos, con angioqueratomas en los muslos, nalgas y genitales, hipohidrosis, parestesia en las extremidades, córnea verticillata y cataratas subcapsulares posteriores de tipo rayo. Los depósitos de este material pueden dar como resultado dolor, enfermedad renal y cardiovascular grave y accidente cerebrovascular. La acumulación de glicolípidos puede inducir síntomas graves tal como se observa normalmente en varones que padecen la enfermedad de Fabry. Alternativamente, la acumulación puede inducir síntomas relativamente leves, tal como puede observarse algunas veces en mujeres heterocigóticas que portan el gen defectuoso. Los individuos afectados tienen una esperanza de vida acortada en gran medida; la muerte resulta normalmente de complicaciones renales, cardíacas o cerebrovasculares a aproximadamente 40 años de edad. No existen tratamientos específicos para esta enfermedad. La enfermedad de Fabry, clasificada como trastorno de almacenamiento lisosomal, afecta a más de 15.000 personas en todo el mundo.

La enfermedad de Fabry tal como se definió anteriormente es un síndrome clínico complejo caracterizado por una afectación multiorgánica y multisistémica. Los pacientes que manifiestan la combinación de distrofia de la córnea, lesiones cutáneas (angioqueratoma), neuropatía dolorosa, enfermedad vascular cerebral, cardiomiopatía y disfunción renal se clasifican como que presentan el fenotipo "clásico". Sin embargo, existen pacientes que manifiestan algunos, pero no todos, los aspectos del fenotipo clásico. Estos pacientes se clasifican como "variantes atípicas de la enfermedad de Fabry". Existen varios fenotipos de variantes atípicas asociados con deficiencia de  $\alpha$ -galactosidasa. Por ejemplo, algunos pacientes con deficiencia de  $\alpha$ -galactosidasa tienen una variación de la enfermedad de Fabry con sólo afectación cardíaca, por ejemplo, hipertrofia ventricular izquierda (HVI). Existe también otro fenotipo de variante en el que los pacientes presentan sólo afectación renal. Aunque ambos de estos fenotipos de variante se han definido en hombres hemocigóticos, las formas variantes de la enfermedad de Fabry también se han descrito en mujeres heterocigóticas.

Los pacientes con la variante cardíaca atípica presentan generalmente enfermedad asintomática más tarde en su vida. La edad media de diagnóstico para los pacientes con el fenotipo de variante cardíaca es de aproximadamente 52 años en comparación con aproximadamente 29 años para el fenotipo clásico (Desnick, *et al.*, en *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 6ª edición (1996). Scriver, *et al.*, (eds), McGraw-Hill (Nueva York). págs. 2741-2784; Meikle, *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 281: 249 - 254 (1999)). Los pacientes con este síndrome presentan a menudo síntomas sutiles de disfunción cardíaca tales como disnea por esfuerzo. Habitualmente, un análisis ecocardiográfico convencional revela que los pacientes con el fenotipo de variante cardíaca tienen hipertrofia ventricular izquierda (HVI) o hipertrofia septal asimétrica. Sin embargo, los pacientes también pueden presentar infarto de miocardio o cardiomiopatía (Scheidt, *et al.*, *New Engl. J. Med.* 324: 395 - 399 (1991); Nakao, *et al.*, *New Engl. J. Med.* 333: 288 - 293 (1995)). Estos pacientes se someten a menudo a biopsias de miocardio, y la patología del síndrome de la variante es esencialmente similar a la enfermedad de Fabry clásica: infiltración de miocardio por glicolípido depositado. Los ensayos enzimáticos de  $\alpha$ -galactosidasa A en estos pacientes revelan un amplio intervalo de niveles enzimáticos. Por ejemplo, se ha notificado que pacientes con la variante cardíaca tienen niveles de hasta al 30% de los normales de actividad enzimática de  $\alpha$ -galactosidasa A, y, por tanto, hasta ahora no se han considerado como candidatos para una terapia sustitutiva de  $\alpha$ -Gal A.

Los inventores han descubierto ahora de manera inesperada que, aunque los pacientes con la variante cardíaca atípica o la variante renal atípica pueden tener niveles de actividad enzimática de  $\alpha$ -galactosidasa A que son relativamente altos en comparación con pacientes con el fenotipo clásico de la enfermedad de Fabry, estos pacientes también pueden beneficiarse de la terapia con la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A. Por ejemplo, los pacientes pueden tener una mutación que produce una enzima  $\alpha$ -Gal A cinéticamente inestable en la célula, y en estos pacientes pueden aumentarse significativamente los niveles de enzima  $\alpha$ -Gal A mediante la administración de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A de la presente invención. Además, se ha notificado que algunos pacientes con el fenotipo de variante cardíaca atípica tienen una mutación puntual en el aminoácido 215 de la  $\alpha$ -galactosidasa A. Este aminoácido en la proteína no mutada es una asparagina que está glicosilada (Eng, *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 53: 1186 - 1197. (1993)). Por tanto, la terapia sustitutiva con la enzima  $\alpha$ -Gal A con una preparación de  $\alpha$ -galactosidasa A apropiadamente glicosilada de la presente invención puede ser eficaz en estos pacientes. Además, se han notificado pacientes con la variante renal atípica cuya única manifestación clínica de la enfermedad de Fabry es proteinuria leve. Sin embargo, la biopsia renal revela las inclusiones típicas de glicolípidos de la enfermedad de Fabry y el ensayo enzimático de  $\alpha$ -Gal A revela niveles de  $\alpha$ -Gal A inferiores a los normales. Sin embargo, debido a que puede detectarse trihexósido de ceramida depositado en el riñón en células tubulares renales desprendidas en el sedimento de la orina de estos pacientes, la administración de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A de la presente invención puede reducir sustancialmente estos niveles. Enzimas lisosomales tales como  $\alpha$ -Gal A se

dirigen al compartimento lisosomal de una célula a través de la interacción con el receptor de manosa-6-fosfato (M6P), que se une a residuos de M6P presentes en los restos de oligosacáridos de enzimas destinadas al compartimento lisosomal. Komfeld & Mellman, *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 483-525 (1989). La interacción primaria se produce en el aparato de Golgi, en el que las enzimas unidas a receptores de M6P del aparato de Golgi se segregan para su transporte hasta los lisosomas. Se cree que tiene lugar un tipo de interacción secundario entre la  $\alpha$ -Gal A extracelular y los receptores de M6P en la superficie celular. Las enzimas que escapan del sistema de encaminamiento se secretan por la célula mediante la ruta secretora constitutiva y a menudo vuelven a captarse por los receptores de M6P de la superficie celular que devuelven la  $\alpha$ -galactosidasa A al lisosoma mediante la ruta endocítica. Las sustancias extracelulares internalizadas por las células se transportan a través del citoplasma en vesículas endocíticas, que se fusionan con lisosomas primarios y vacían su contenido en los lisosomas. En este proceso, los receptores de M6P de la superficie celular también se incorporan en las vesículas endocíticas y se transportan hasta los lisosomas. En particular, las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A en las que están presentes altos niveles de sialilación y/o fosforilación, se prefieren para el tratamiento de pacientes con variantes atípicas de la enfermedad de Fabry. Tales preparaciones, por ejemplo, minimizan la fracción de la  $\alpha$ -Gal A inyectada que se elimina por los hepatocitos y permiten altos niveles de captación de  $\alpha$ -Gal A por células que no son hepáticas, tales como células renales, células vasculares, células tubulares, células glomerulares, miocitos cardíacos y células vasculares cardíacas.

La  $\alpha$ -Gal A extracelular que lleva residuos de M6P puede unirse a receptores de M6P de la superficie celular y transportarse en el compartimento lisosomal. Una vez en el compartimento lisosomal, una  $\alpha$ -Gal A puede llevar a cabo la función apropiada. Es este aspecto del tráfico enzimático lisosomal el que hace que la terapia sustitutiva con la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A sea un tratamiento terapéutico viable para los pacientes con la enfermedad de Fabry. Por tanto, incluso si una célula es genéticamente deficiente en la producción de  $\alpha$ -Gal A, la célula puede captar  $\alpha$ -Gal A extracelular si la  $\alpha$ -Gal A está adecuadamente glicosilada y la célula deficiente lleva receptores de M6P. En pacientes con la enfermedad de Fabry, las células endoteliales vasculares del riñón y del corazón presentan anomalías histopatológicas graves y contribuyen a la patología clínica de la enfermedad. Estas células, que portan receptores de M6P, son una diana terapéutica particular de  $\alpha$ -Gal A. Se proporciona una preparación de  $\alpha$ -Gal A en la que está presente M6P en los oligosacáridos unidos en N.

El grado en el que los oligosacáridos unidos en N de  $\alpha$ -Gal A se modifican mediante la sialilación tiene un efecto sustancial sobre la farmacocinética y biodistribución de  $\alpha$ -Gal A. En ausencia de sialilación apropiada,  $\alpha$ -Gal A se aclara rápidamente de la circulación debido a la unión mediante receptores de asialoglicoproteína hepáticos (receptores Ashwell), seguido por la internalización y degradación por los hepatocitos. Ashwell & Harford, *Ann. Rev. Biochem.* 51: 531-554 (1982). Esto disminuye la cantidad de  $\alpha$ -Gal A disponible en la circulación para su unión a receptores de M6P sobre las células, lo que contribuye a la patología clínica de la enfermedad de Fabry, tal como las células endoteliales vasculares del riñón y corazón. La  $\alpha$ -Gal A secretada por células humanas modificadas genéticamente tiene propiedades de glicosilación que son adecuadas para el tratamiento de la enfermedad de Fabry o bien mediante la administración farmacéutica convencional de la proteína secretada purificada o bien mediante terapia génica, sin requerir modificación enzimática adicional tal como se ha notificado que se requiere para la enzima lisosomal, glucocerebrosidasa, en la que la captación de enzima glucocerebrosidasa purificada mediante células clínicamente relevantes requiere modificación enzimática compleja de la enzima tras la purificación a partir de placenta humana. Beutler, *New Engl. J. Med.* 325: 1354-1360 (1991).

#### **Células adecuadas para la producción de $\alpha$ -Gal A**

Un individuo que se sospecha que tiene una deficiencia de  $\alpha$ -Gal A tal como enfermedad de Fabry puede tratarse con  $\alpha$ -Gal A humana purificada obtenida a partir de células cultivadas, genéticamente modificadas, preferiblemente células humanas.

Cuando las células deben modificarse genéticamente para los fines de tratamiento de la enfermedad de Fabry, las células pueden modificarse mediante procedimientos de ingeniería genética convencionales o mediante activación génica.

Según procedimientos convencionales, una molécula de ADN que contiene una secuencia de ADNc o ADN genómico de  $\alpha$ -Gal A puede estar contenida dentro de un constructo de expresión y transfectarse en células primarias, secundarias o inmortalizadas mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por liposomas, polibreno o DEAE dextrano, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección o micropoyectiles impulsados por velocidad ("biolística") (véase, por ejemplo, una solicitud copendiente, USNN 08/334.797).

Alternativamente, puede usarse un sistema que suministre la información genética mediante un vector viral. Los virus que se sabe que son útiles para la transferencia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de las paperas, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis y virus vaccinia tal como virus de la viruela del canario.

Alternativamente, las células pueden modificarse usando un enfoque de activación génica (“GA”), tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.733.761 y 5.750.376. La  $\alpha$ -Gal A preparada mediante activación génica se denomina en el presente documento GA-GAL.

5 Por consiguiente, se pretende que la expresión “genéticamente modificado”, tal como se usa en el presente documento en referencia a células, abarque células que expresan un producto génico particular tras la introducción de una molécula de ADN que codifica para el producto génico y/o elementos reguladores que controlan la expresión de una secuencia codificante para el producto génico. La molécula de ADN puede introducirse mediante selección como diana de genes o recombinación homóloga, es decir, introducción de la molécula de ADN en un sitio genómico particular. La recombinación homóloga puede usarse para sustituir el propio gen defectuoso (puede sustituirse el gen de  $\alpha$ -Gal A defectuoso o una parte del mismo en las propias células del paciente con la enfermedad de Fabry por el gen completo o una parte del mismo).

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “célula primaria” incluye células presentes en una suspensión de células aisladas de una fuente de tejido de vertebrado (antes de sembrarse en placas, es decir, fijadas a un sustrato de cultivo de tejidos tal como una placa o frasco), células presentes en un explante derivado del tejido, ambos tipos previos de células sembradas en placa por primera vez y suspensiones de células derivadas de estas células sembradas en placa.

20 “Células secundarias” se refiere a células en todas las etapas posteriores de cultivo. Es decir, la primera vez que se retira una célula primaria sembrada en placa del sustrato de cultivo y se vuelve a sembrar en placa (pase), se denomina célula secundaria, como todas las células en pases posteriores.

25 Una “cepa celular” consiste en células secundarias que se han pasado una o más veces; presentan un número finito de duplicaciones medias de la población en cultivo; presentan las propiedades de crecimiento inhibido por contacto, dependiente de anclaje (excepto para células propagadas en cultivo en suspensión); y no están inmortalizadas.

30 Por “célula inmortalizada” se quiere decir una célula de una línea celular establecida que presenta una vida útil aparentemente ilimitada en cultivo.

Los ejemplos de células primarias o secundarias incluyen fibroblastos, células epiteliales incluyendo células epiteliales mamarias e intestinales, células endoteliales, elementos formados de la sangre incluyendo linfocitos y células de la médula ósea, células gliales, hepatocitos, queratinocitos, células musculares, células neurales o los precursores de estos tipos de células. Los ejemplos de líneas celulares humanas inmortalizadas útiles en los presentes procedimientos incluyen, pero no se limitan a, células de melanoma de Bowes (número de acceso de la ATCC CRL 9607), células Daudi (número de acceso de la ATCC CCL 213), células HeLa y derivados de células HeLa (números de acceso de la ATCC CCL 2, CCL 2,1, y CCL 2,2), células HL-60 (número de acceso de la ATCC CCL 240), células HT-1080 (número de acceso de la ATCC CCL 121), células Jurkat (número de acceso de la ATCC TIB 152), células de carcinoma KB (número de acceso de la ATCC CCL 17), células de leucemia K-562 (número de acceso de la ATCC CCL 243), células de cáncer de mama MCF-7 (número de acceso de la ATCC BTH 22), células MOLT-4 (número de acceso de la ATCC 1582), células Namalwa (número de acceso de la ATCC CRL 1432), células Raji (número de acceso de la ATCC CCL 86), células RPMI 8226 (número de acceso de la ATCC CCL 155), células U-937 (número de acceso de la ATCC CRL 1593), células 2R4 sublínea WI-38VA13 (número de acceso de la ATCC CLL 75.1), células CCRF-CEM (número de acceso de la ATCC CCL 119) y células de carcinoma de ovario 2780AD (Van der Blick *et al.*, Cancer Res. 48: 5927-5932, 1988), así como células de heterohibridoma producidas mediante fusión de células humanas y células de otras especies.

50 Tras la modificación genética de células humanas para producir una célula que secreta  $\alpha$ -Gal A, puede generarse una cepa celular clonal que consiste esencialmente en una pluralidad de células humanas primarias cultivadas genéticamente idénticas o, cuando las células están inmortalizadas, una línea celular clonal que consiste esencialmente en una pluralidad de células humanas inmortalizadas genéticamente idénticas. En una realización, las células de la cepa celular clonal o línea celular clonal son fibroblastos. En una realización preferida, las células son fibroblastos humanos secundarios, por ejemplo, células BRS-11.

55 Tras la modificación genética, las células se cultivan en condiciones que permiten la secreción de  $\alpha$ -Gal A. La proteína se aísla de las células cultivadas recogiendo el medio en el que se hacen crecer las células, y/o lisando las células para liberar su contenido, y aplicando luego técnicas de purificación de proteínas.

#### 60 **Purificación de $\alpha$ -Gal A a partir de medio condicionado de células transfectadas de manera estable.**

La proteína  $\alpha$ -Gal A se aísla de las células cultivadas (“células de producción de  $\alpha$ -Gal A”) recogiendo el medio en el que se hacen crecer las células, o lisando las células para liberar su contenido, y aplicando luego técnicas de purificación de proteínas sin el uso de cromatografía de afinidad de lectina. El procedimiento de purificación preferido se expone en el ejemplo 2 a continuación.

También pueden usarse para purificar  $\alpha$ -Gal A resinas de interacción hidrófoba alternativas, tales como Source Iso (Pharmacia), Macro-Prep® Methyl Support (Bio-Rad), TSK Butyl (Tosohaas) o fenil-Sepharose® (Pharmacia). La columna puede equilibrarse en una concentración relativamente alta de una sal, por ejemplo sulfato de amonio 1 M o cloruro de sodio 2 M, en un tampón de pH 5,6. La muestra que va a purificarse se prepara ajustando el pH y la concentración de sal hasta las del tampón de equilibrado. Se aplica la muestra a la columna y se lava la columna con tampón de equilibrado para eliminar el material no unido. Se eluye la  $\alpha$ -Gal A de la columna con un tampón de fuerza iónica inferior, agua o disolvente orgánico en agua, por ejemplo etanol al 20% o propilenglicol al 50%. Alternativamente, puede hacerse que la  $\alpha$ -Gal A fluya a través de la columna usando una concentración inferior de sal en el tampón de equilibrado y en la muestra o usando un pH diferente. Pueden unirse otras proteínas a la columna, dando como resultado la purificación de la muestra que contiene  $\alpha$ -Gal A que no se unió a la columna. Una primera etapa de purificación preferida es el uso de una columna de hidroxipatito.

Una etapa alternativa de purificación puede usar una resina de intercambio catiónico, por ejemplo SP Sepharose® 6 Fast Flow (Pharmacia), Source 30S (Pharmacia), CM Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Macro-Prep® CM Support (Bio-Rad) o Macro-Prep® High S Support (Bio-Rad), para purificar la  $\alpha$ -Gal A. La "primera etapa de cromatografía" es la primera aplicación de una muestra a una columna de cromatografía (se excluyen todas las etapas asociadas con la preparación de la muestra). La  $\alpha$ -Gal A puede unirse a la columna a pH 4,4. Puede usarse para equilibrar la columna un tampón, tal como acetato de sodio 10 mM, pH 4,4, citrato de sodio 10 mM, pH 4,4 u otro tampón con capacidad de tamponamiento adecuada a aproximadamente pH 4,4. La muestra que va a purificarse se ajusta hasta el pH y la fuerza iónica del tampón de equilibrado. Se aplica la muestra a la columna y se lava la columna tras la carga para eliminar el material no unido. Puede usarse una sal, tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio, para eluir la  $\alpha$ -Gal A de la columna. Alternativamente, la  $\alpha$ -Gal A puede eluirse de la columna con un tampón de pH superior o una combinación de concentración de sal superior y pH superior. La  $\alpha$ -Gal A también puede hacerse fluir a través de la columna durante la carga aumentando la concentración de sal en el tampón de equilibrio y en la carga de la muestra, haciendo correr la columna a un pH superior o mediante una combinación tanto de aumento de sal como de pH superior.

Otra etapa de purificación puede usar una resina Q Sepharose® 6 Fast Flow para la purificación de  $\alpha$ -Gal A. Q Sepharose® 6 Fast Flow es una resina de intercambio aniónico relativamente fuerte. También puede usarse una resina de intercambio aniónico más débil, tal como DEAE Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) o Macro-Prep® DEAB (Bio-Rad), para purificar  $\alpha$ -Gal A. La columna se equilibra en un tampón, por ejemplo, fosfato de sodio 10 mM, pH 6. El pH de la muestra se ajusta hasta pH 6 y se obtiene una fuerza iónica baja mediante dilución o diafiltración de la muestra. Se aplica la muestra a la columna en condiciones que unen la  $\alpha$ -Gal A. Se lava la columna con tampón de equilibrado para eliminar el material no unido. Se eluye la  $\alpha$ -Gal A con aplicación de sal, por ejemplo, cloruro de sodio o cloruro de potasio, o aplicación de un tampón de pH inferior, o una combinación de aumento de sal y de pH inferior. La  $\alpha$ -Gal A también puede hacerse fluir a través de la columna durante la carga aumentando la concentración de sal en la carga o haciendo correr la columna a un pH inferior, o mediante una combinación tanto de aumento de sal como de pH inferior.

Otra etapa de purificación puede usar una cromatografía de exclusión molecular Superdex® 200 (Pharmacia) para la purificación de  $\alpha$ -Gal A. Otras resinas de cromatografía de exclusión molecular tales como Sephacryl® S-200 HR o Bio-Gel® A-1.5 m también pueden usarse para purificar la  $\alpha$ -Gal A. El tampón preferido para la cromatografía de exclusión molecular es fosfato de sodio 25 mM, pH 6,0, que contiene cloruro de sodio 0,15 M. También pueden usarse otros tampones compatibles con la formulación, por ejemplo, citrato de potasio o de sodio 10 mM. El pH del tampón puede estar entre pH 5 y pH 7 y debe contener una sal, por ejemplo, cloruro de sodio o una mezcla de cloruro de sodio y cloruro de potasio.

Otra etapa de purificación puede usar una resina de cromatoenfoco tal como Polybuffer Exchanger PBE 94 (Pharmacia) para purificar la  $\alpha$ -Gal A. La columna se equilibra a pH relativamente alto (por ejemplo, pH 7 o superior), el pH de la muestra que va a purificarse se ajusta hasta el mismo pH y se aplica la muestra a la columna. Se eluyen las proteínas con un gradiente de pH decreciente hasta un pH tal como pH 4, usando un sistema de tampón, por ejemplo, Polybuffer 74 (Pharmacia), que se había ajustado hasta pH 4.

Alternativamente, puede usarse cromatografía de inmunoafinidad para purificar la  $\alpha$ -Gal A. Puede inmovilizarse un anticuerpo policlonal o monoclonal apropiado frente a  $\alpha$ -Gal A (generado mediante inmunización con  $\alpha$ -Gal A o con un péptido derivado de la secuencia de  $\alpha$ -Gal A usando técnicas convencionales) sobre una resina de acoplamiento activada, por ejemplo Sepharose® 4 Fast Flow (Pharmacia) activada con NHS o Sepharose® 4 Fast Flow (Pharmacia) activada con CNBr. La muestra que va a purificarse puede aplicarse a la columna con anticuerpo inmovilizado a aproximadamente pH 6 o pH 7. Se lava la columna para eliminar el material no unido. Se eluye la  $\alpha$ -Gal A de la columna con reactivos típicos utilizados para elución de columna de afinidad tales como pH bajo, por ejemplo, pH 3, desnaturizante, por ejemplo, guanidina HCl o tiocianato, o disolvente orgánico, por ejemplo, propilenglicol al 50% en un tampón a pH 6. El procedimiento de purificación también puede usar una resina de afinidad de quelatos de metal, por ejemplo, Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) quelante para purificar la  $\alpha$ -Gal A. La columna se carga previamente con iones metálicos, por ejemplo  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o

Cd<sup>2+</sup>. La muestra que va a purificarse se aplica a la columna a un pH apropiado, por ejemplo, de pH 6 a pH 7,5 y se lava la columna para eliminar las proteínas no unidas. Se eluyen las proteínas unidas mediante elución competitiva con imidazol o histidina o disminuyendo el pH usando citrato de sodio o acetato de sodio hasta un pH inferior a 6, o introduciendo agentes quelantes, tales como EDTA o EGTA.

5

Según los protocolos anteriores, se proporcionan preparaciones con una preparación de  $\alpha$ -Gal A de pureza superior a la preparada en la técnica anterior, purificada hasta al menos una homogeneidad del 98%, más preferiblemente hasta al menos una homogeneidad del 99% y lo más preferiblemente hasta al menos una homogeneidad del 99,5%, tal como se mide mediante SDS-PAGE o HPLC en fase inversa. Las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A pueden comprender numerosas glicofomas de la  $\alpha$ -Gal A. Por consiguiente, el término "homogeneidad", tal como se usa en el presente documento en el contexto de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A, se refiere a preparaciones que están sustancialmente libres (<2% de las proteínas totales) de proteínas diferentes de  $\alpha$ -Gal A. Ejemplos de proteínas que no son  $\alpha$ -Gal A tales como albúmina, proteínas que no son  $\alpha$ -Gal A producidas por la célula huésped y proteínas que no son  $\alpha$ -Gal A aisladas de tejido o fluido animal. La actividad específica de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A de la presente invención es preferiblemente al menos de  $2,0 \times 10^6$  unidades/mg de proteína, más preferiblemente al menos de  $3,0 \times 10^6$  unidades/mg de proteína y lo más preferiblemente al menos de  $3,5 \times 10^6$  unidades/mg de proteína.

10

15

20

### **Mejora de la semivida en circulación de preparaciones de $\alpha$ -Gal A mediante remodelación con glucanos para aumentar la carga de oligosacáridos**

Se proporciona un programa de modificación con glicoproteína para lograr un aumento de la captación de una enzima terapéutica en tejidos específicos diferentes de hígado y macrófagos usando los procedimientos divulgados en el presente documento, se obtienen preparaciones de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana, en las que entre el 35% y el 85% de los oligosacáridos están cargados, estando preferiblemente al menos el 50% de los oligosacáridos cargados.

25

30

35

40

45

La N-glicosilación de proteínas funciona modificando residuos de asparagina apropiados de proteínas con estructuras de oligosacáridos, influyendo así en sus propiedades y bioactividades. Kukuruzinska & Lennon, Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 9: 415-48 (1998). Se proporciona una preparación de  $\alpha$ -Gal A aislada en la que un alto porcentaje de los oligosacáridos están cargados negativamente, principalmente mediante la adición de uno a cuatro residuos de ácido siálico sobre glucanos complejos, o de uno a dos restos fosfato sobre glucanos con alto contenido en manosa, o de un único fosfato y un único ácido siálico sobre glucanos híbridos. También pueden estar presentes cantidades más pequeñas de glucanos complejos sulfatados. Una alta proporción de estructuras cargadas sirve para dos funciones principales. En primer lugar, la limitación ocupación de los penúltimos residuos de galactosa mediante ácido siálico unido en 2,3 o en 2,6 evita la eliminación prematura de la circulación mediante el receptor de asialoglicoproteína presente en hepatocitos. Este receptor reconoce glicoproteínas con residuos de galactosa terminales. El aumento de la semivida en circulación de  $\alpha$ -Gal A da a órganos diana importantes tales como el corazón y el riñón la oportunidad de endocitar mayores cantidades de enzima del plasma tras la infusión de la enzima. En segundo lugar, la presencia de Man-6-fosfato en glucanos híbridos o con alto contenido en manosa proporciona una oportunidad para la captación mediada por receptor mediante el receptor de Man-6-fosfato independiente de catión (CI-MPR). Esta captación mediada por receptor se produce sobre la superficie de muchas células, incluyendo células endoteliales vasculares, que son un sitio de almacenamiento importante de CTH en pacientes con Fabry. Las moléculas de enzima con dos residuos de Man-6-fosfato tienen una afinidad mucho mayor por el CI-MPR que las que tienen un único Man-6-fosfato. Se proporcionan estructuras de glucano representativas en la tabla 1.

50

55

60

65

Tabla 1  
Estructuras de glucano representativas

Un glucano con dos antenas:

5  $\pm\text{Fuc}\alpha 1,6$   
 $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$  |  
 $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc-Asn}$   
 10  $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$

Un glucano con cuatro antenas:

15  $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,6 \setminus$   $\pm\text{Fuc}\alpha 1,6$   
 $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$  |  
 $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc-Asn}$   
 $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$   
 20  $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4 /$

Un glucano con alto contenido en manosa:

25  $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$   $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc-Asn}$   
 $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$

Un glucano híbrido fosforilado:

30  $\text{P-Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,3 /$   $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc-Asn}$   
 35  $\text{SA}\alpha 2,3/6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$

Un glucano bifosforilado:

40  $\text{P-Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,3 /$   $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc-Asn}$   
 $\text{P-Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$

45 La biosíntesis de N-glicoproteínas implica una multitud de enzimas, glicosiltransferasas y glicosidasas. La mayoría de estas enzimas funcionan en el retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi de una manera ordenada y bien orquestada. La complejidad de la N-glicosilación aumenta por el hecho de que pueden modificarse diferentes residuos de asparagina dentro del mismo polipéptido con diferentes estructuras de oligosacáridos, y se distinguen diversas proteínas entre sí mediante las características de sus restos de hidratos de carbono. Recientes avances en la genética molecular han acelerado la identificación, aislamiento y caracterización de los genes de N-glicosilación. Como resultado, ha surgido información referente a las relaciones entre la N-glicosilación y otras funciones celulares.

55 El procesamiento de glicoproteínas unidas en N en la célula comienza cuando se añade una cadena de oligosacárido con  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  a una asparagina aceptora en un péptido naciente en el lumen del RE como una única unidad. Se construye una cadena de oligosacárido de catorce azúcares que consiste en  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  en dolicol, un alcohol alifático de cadena muy larga:

60  $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,6 \setminus$   
 $\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$   $\text{Man}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,4\text{GlcNAc-PP- Dolicol}$   
 $\text{Glc}\alpha 1,2\text{Glc}\alpha 1,3\text{Glc}\alpha 1,3\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,2\text{Man}\alpha 1,3 /$

65 Este oligosacárido se transfiere como una única unidad a un residuo de asparagina aceptora en una cadena de péptido naciente en el lumen del RE. El gran tamaño del glucano en relación con el péptido puede guiar el plegado de la proteína. Los tres residuos de glucosa sirven como una señal de que el oligosacárido está completo

y listo para su transferencia mediante la oligosacaril transferasa. Esta enzima también transferirá oligosacáridos no glucosilados pero sólo a una fracción de la tasa de la cadena completada debido a que estos son sustratos inferiores a los óptimos. Se ha mostrado que una forma de síndrome de glicoproteína deficiente en hidratos de carbono en seres humanos está provocada por una deficiencia de Dolicol-P-Glc: Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dolicol glucosil transferasa, la primera enzima en la ruta de adición de glucosa, que da como resultado la hipoglicosilación de proteínas séricas. Korner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13200-13205 (1998). Tras la eliminación de los tres residuos de glucosa y lograr la conformación correcta, la glicoproteína recién sintetizada se exporta al aparato de Golgi. Dependiendo de la accesibilidad del glucano a manosidasas del aparato de Golgi tras el plegamiento de la proteína, la cadena de glucano puede permanecer como una cadena con alto contenido en manosa con 5-9 residuos de manosa. Alternativamente, la cadena de glucano puede procesarse adicionalmente para dar un núcleo de trimanosilo, y convertirse en un aceptor para otras glicosil transferasas que forman cadenas complejas mediante la adición de más residuos de GlcNac, seguido por Gal, NeuAc y Fuc. Una tercera posibilidad, si la proteína tiene dos residuos de lisina separados exactamente por 34 angstroms y en la relación espacial correcta respecto a una cadena con alto contenido en manosa, es la adición de GlcNAc-1-PO<sub>4</sub> sobre el carbono 6 de uno, o algunas veces dos, residuos de manosa. Cuzzo *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 21069-21076 (1998). Tras la eliminación de la GlcNac unida en  $\alpha$  mediante una enzima específica, se genera un epítipo de M6P terminal que se reconoce por un receptor de M6P en la red de Golgi en trans que luego dirige estas enzimas hacia lisosomas en células de origen mesenquimal.

Para dirigir  $\alpha$ -Gal A a tantos tejidos diferentes como sea posible, son útiles muchas estructuras de hidratos de carbono diferentes (glicofomas). Matsuura *et al.*, *Glycobiology* 8: 329-339 (1998) notificaron que las estructuras de glucano en  $\alpha$ -Gal A humana preparada en células CHO tenían un 41% de glucanos con alto contenido en manosa y el nivel de fosforilación era del 24%. Sin embargo, el nivel de glucanos complejos sialilados era de solo el 11%. Por tanto, 2/3 de las cadenas complejas no estaban sialiladas, lo que da como resultado la rápida eliminación de la  $\alpha$ -Gal A por el hígado. La  $\alpha$ -Gal A producida en las células humanas de la invención tienen un porcentaje superior de oligosacáridos cargados que la  $\alpha$ -Gal A de la técnica anterior producida en células CHO. Por ejemplo, la  $\alpha$ -Gal A sintetizada en células HT-1080 descrita en el presente documento es particularmente adecuada, debido a que la  $\alpha$ -Gal A producida en células HT-1080 contiene aproximadamente un 15% de estructuras neutras (con alto contenido en manosa e híbridas), aproximadamente un 16% de glucanos fosforilados y aproximadamente un 67% de glucanos complejos con de 2 a 4 residuos de ácido siálico. Por tanto, esencialmente todas las cadenas complejas están sialiladas en comparación con la  $\alpha$ -Gal A producida en células CHO. La  $\alpha$ -Gal A de células HT-1080 tiene tres sitios de glicosilación unidos en N. Dos sitios se procesan para dar glucanos complejos en el aparato de Golgi, mientras que el tercer sitio está ocupado por un glucano con alto contenido en manosa, el 50% del cual está modificado mediante fosforilación específica de enzimas lisosomales para producir tanto especies monofosforiladas como difosforiladas.

Se proporcionan cuatro enfoques para la remodelación con hidratos de carbono en una proteína que contiene cadenas de glucano unidas en N. En primer lugar, puede aumentarse la proporción de  $\alpha$ -Gal A cargada mediante el aislamiento selectivo de glicofomas durante el procedimiento de purificación. La presente invención proporciona el aumento de la proporción de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A sumamente cargadas y de peso molecular superior mediante el fraccionamiento de especies de  $\alpha$ -Gal A en resinas de columna de cromatografía durante y/o tras el procedimiento de purificación. Las especies de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A más sumamente cargadas contienen más ácido siálico y/o más fosfato, y las glicofomas de peso molecular superior también contendrán las especies completamente glicosiladas, lo más sumamente ramificadas y sumamente cargadas. La selección de especies cargadas, o la eliminación de las especies de  $\alpha$ -Gal A no glicosiladas, escasamente glicosiladas o escasamente sialiladas y/o fosforiladas dará como resultado una población de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A con más ácido siálico y/o más fosfato, proporcionando por tanto una preparación de  $\alpha$ -Gal A con semivida superior y eficacia terapéutica potencial.

Este procedimiento de fraccionamiento puede producirse en, pero no se limita a, resinas de columna cromatográficas adecuadas utilizadas para purificar o aislar  $\alpha$ -Gal A. Por ejemplo, el fraccionamiento puede producirse en, pero no se limita a, resinas de intercambio catiónico (tales como SP-Sepharose®), resinas de intercambio aniónico (Q-Sepharose®), resinas de afinidad (Heparina-Sepharose®, columnas de lectina), columnas de exclusión molecular (Superdex® 200) y columnas de interacción hidrófoba (Butil-Sepharose®) y otras resinas de columna cromatográficas conocidas en la técnica.

Dado que se produce  $\alpha$ -Gal A en las células como una mezcla heterogénea de glicofomas que difieren en el peso molecular y la carga,  $\alpha$ -Gal A tiende a eluir en picos relativamente anchos de las resinas de cromatografía. Dentro de estas eluciones, las glicofomas se distribuyen de una manera particular dependiendo de la naturaleza de la resina que está utilizándose. Por ejemplo, en la cromatografía de exclusión molecular, las glicofomas más grandes tenderán a eluirse más pronto en el perfil de elución que las glicofomas más pequeñas.

En la cromatografía de intercambio iónico, las glicofomas cargadas más negativamente tenderán a unirse a una resina cargada positivamente (tal como Q-Sepharose®) con afinidad superior que las glicofomas cargadas menos negativamente, y por tanto tenderán a eluirse más tarde en el perfil de elución. En cambio, estas glicofomas cargadas de manera sumamente negativa pueden unirse menos fuertemente a una resina cargada negativamente,

tal como SP Sepharose®, que las especies cargadas menos negativamente, o incluso puede no unirse en absoluto.

El fraccionamiento de las especies de glicofomas en resinas cromatográficas puede verse influido mediante el pH, fuerza iónica, selección de la sal del tampón, viscosidad y/u otros parámetros tales como la elección del tipo de resina. El uso de diversos tipos de eluciones en gradiente (gradientes lineales en línea recta, curvada, por ejemplo, gradientes exponenciales) o el uso de una serie de eluciones en etapas cortas para eluir selectivamente especies de  $\alpha$ -Gal A de la columna de cromatografía también pueden optimizarse para el fraccionamiento de  $\alpha$ -Gal A. Todos estos factores, solos o en combinación, pueden optimizarse para lograr un fraccionamiento eficaz de las glicofomas. El fraccionamiento también puede producirse tras completarse el procedimiento de purificación, en una resina cromatográfica particular optimizada selectivamente para el fraccionamiento y selección de la población de glicofomas deseada.

La selección de poblaciones de glicofomas a partir de las especies de  $\alpha$ -Gal A fraccionadas puede lograrse tras el análisis de las glicofomas de  $\alpha$ -Gal A eluidas. El pico de elución puede analizarse mediante diversas técnicas tales como, pero sin limitarse a, SDS-PAGE, isoelectroenfoque, electroforesis capilar, HPLC de intercambio iónico analítica y/o HPLC de exclusión molecular analítica. Pueden seleccionarse fracciones particulares que tienen hacia el tamaño o perfil de carga deseados. La selección puede producirse en cualquier etapa cromatográfica del procedimiento, permitiendo la consecución gradual de la población de glicofomas deseada, o puede limitarse a una etapa o etapas particulares si la eficacia de fraccionamiento de la(s) etapa(s) es alta. El fraccionamiento también puede producirse tras completarse el procedimiento de purificación, en una resina cromatográfica particular optimizada selectivamente para el fraccionamiento y selección de la población de glicofomas deseada.

El fraccionamiento y selección de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A sumamente cargadas y/o de peso molecular superior puede realizarse en cualquier preparación de  $\alpha$ -Gal A, tal como la derivada de células modificadas genéticamente tales como células modificadas mediante procedimientos de ingeniería genética convencionales o mediante activación génica (GA). Puede realizarse sobre líneas celulares que se hacen crecer en sistemas optimizados para proporcionar sialilación y fosforilación superiores tal como se describió anteriormente, o  $\alpha$ -Gal A pegilada tal como se describe a continuación.

Por ejemplo, en el procedimiento de purificación de  $\alpha$ -Gal A tal como se describe en el presente documento, el fraccionamiento de las glicofomas de  $\alpha$ -Gal A puede producirse a diversas etapas en el procedimiento. En la resina hidrófoba, butil-Sepharose® Fast Flow, las glicofomas de  $\alpha$ -Gal A más sumamente cargadas eluyen en primer lugar, seguidas por las especies menos sumamente cargadas. Para la Heparina-Sepharose®, las especies más sumamente cargadas eluyen también en primer lugar en el pico de elución, seguidas por las especies menos sumamente cargadas. Se produce lo contrario con Q-Sepharose®, en la que las especies menos sumamente cargadas eluyen en primer lugar, seguidas por las glicofomas más sumamente cargadas. En la cromatografía de exclusión molecular sobre Superdex® 200, las glicofomas de peso molecular superior eluyen en primer lugar seguidas por las especies de  $\alpha$ -Gal A de peso molecular inferior, menos glicosiladas. Para permitir un fraccionamiento eficaz de poblaciones de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A particulares, pueden combinarse múltiples etapas cromatográficas, todas las cuales fraccionan según procedimientos físicos diferentes. Por ejemplo, para obtener las glicofomas de  $\alpha$ -Gal A que contienen el pI inferior (las que contienen la carga más negativa), la limitación de la combinación de las fracciones de butilo que eluyen de manera temprana potenciará la  $\alpha$ -Gal A más sumamente cargada. Continuando con esta combinación seleccionada en la columna de heparina, y limitando de nuevo la combinación al más temprano, las especies de  $\alpha$ -Gal A más sumamente cargadas de manera negativa potencian además la proporción de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A con pI bajo en la combinación. El ajuste fino adicional de la población de glicofomas puede realizarse en diversas etapas del procedimiento de purificación monitorizando la distribución de carga y tamaño de las combinaciones de elución mediante SDS-PAGE e isoelectroenfoque. Un ejemplo de fraccionamiento por tamaño y carga se expone a continuación en el ejemplo 2.4.

El segundo enfoque para la remodelación con hidratos de carbono implica modificar ciertas glicofomas en la  $\alpha$ -Gal A purificada mediante la fijación de un residuo de azúcar terminal adicional usando una glicosil transferasa purificada y el donador de azúcar de nucleótido apropiado. Este tratamiento afecta sólo a aquellas glicofomas que tienen un residuo de azúcar terminal libre apropiado para actuar como un aceptor para la glicosil transferasa que está usándose. Por ejemplo, la  $\alpha$ 2,6-sialil transferasa añade ácido siálico en un enlace 2,6 en un aceptor de Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R, usando CMP-ácido siálico como el donador de azúcar de nucleótido. Las enzimas disponibles comercialmente y sus especies de origen incluyen: fucosa  $\alpha$ 1,3 transferasas III, V y VI (seres humanos); galactosa  $\alpha$ 1,3 transferasa (porcina); galactosa  $\beta$ 1,4 transferasa (bovina); manosa  $\alpha$ 1,2 transferasa (levaduras); ácido siálico  $\alpha$ 2,3 transferasa (rata); y ácido siálico  $\alpha$ 2,6 transferasa (rata). Tras completarse la reacción, puede eliminarse la glicosil transferasa de la mezcla de reacción mediante una columna de afinidad específica por glicosil transferasa que consiste en el nucleótido apropiado unido a un gel a través de un espaciador de 6 carbonos mediante un enlace de pirofosfato (GDP, UDP) o fosfato (CMP) o mediante otros procedimientos cromatográficos conocidos en la técnica. De las glicosil transferasas enumeradas anteriormente, las sialil transferasas son particularmente útiles para la modificación de enzimas, tales como  $\alpha$ -Gal A, para la terapia sustitutiva con enzimas en pacientes humanos. El uso de cualquier sialil transferasa con ácido CMP-5-fluoresceinil-neuramínico como donador de azúcar de nucleótido produce una glicoproteína marcada de manera fluorescente cuya captación y ubicación tisular pueden monitorizarse

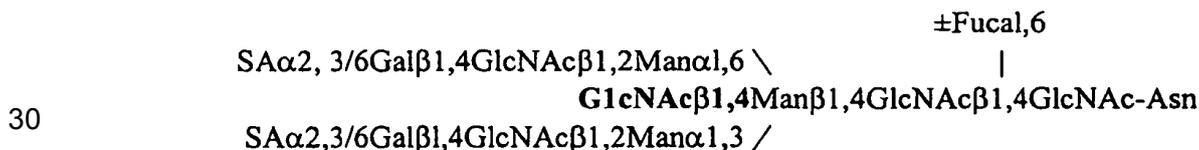
fácilmente.

5 El tercer enfoque para la remodelación con hidratos de carbono implica la glico-modificación por ingeniería, por ejemplo, la introducción de genes que afectan a los mecanismos de glicosilación de la célula, de la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A para modificar el procesamiento postraduccional en el aparato de Golgi es un enfoque preferido.

10 El cuarto enfoque para la remodelación con hidratos de carbono implica tratar la  $\alpha$ -Gal A con glicosidasas apropiadas para reducir el número de glicofomas diferentes presentes. Por ejemplo, el tratamiento secuencial de cadenas de glucano complejas con neuraminidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -hexaminidasa escinde el oligosacárido en el núcleo de trimanosa.

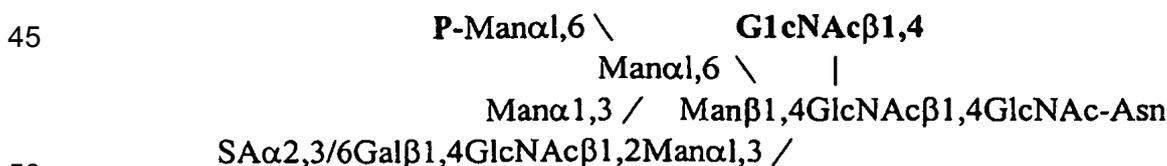
15 La estructura de un glucano unido en N depende de la accesibilidad de la cadena de glucano para las manosidasas de procesamiento del aparato de Golgi después de que la proteína se haya plegado, y la presencia en el aparato de Golgi de una familia de glicosil transferasas y los donadores de azúcar de nucleótido apropiados. Muchas de las glicosil transferasas catalizan reacciones de competición, que pueden dar como resultado que la cadena de glucano se alargue de varias formas diferentes y compatibles, dependiendo de qué enzima reacciona en primer lugar. Esto da como resultado una microheterogeneidad y la formación de una familia compleja de glicofomas. Algunas estructuras son únicas para un único tejido, tal como la modificación de ciertas hormonas hipofisarias mediante la adición de GalNAc-4-SO<sub>4</sub>, o están limitadas a unos pocos órganos.

25 Un ejemplo de lo último es la formación de una denominada GlcNac biseccionada (GlcNac unida en  $\beta$ 1,4 al núcleo del residuo de  $\beta$ -manosa) en glucanos complejos de la glutamiltranspeptidasa en el riñón, pero no en el hígado. Se muestra a continuación una estructura con dos antenas biseccionada en la  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa:



35 En mamíferos, la enzima responsable, GlcNac transferasa III (GnT-III), se encuentra en ciertas células del cerebro y el riñón y en ciertas células del hígado en pacientes con hepatocarcinomas. La GnT-III cataliza la adición de N-acetilglucosamina en enlace  $\beta$  1-4 a la manosa  $\beta$ -unida del núcleo de trimanosilo de cadenas de azúcar unidas en N para producir un residuo de GlcNac biseccionado. Se han clonado los genes de ratón, rata y ser humano para la GnT-III. Ihara *et al.*, J. Biochem. (Tokyo) 113: 692-698 (1993).

40 La presencia de actividad GlcNac T-III adicional en células humanas puede producir un aumento en glucanos híbridos monofosforilados a expensas de los glucanos complejos con dos, tres o cuatro antenas. Esto no debe afectar a la semivida en plasma de manera adversa, pero puede aumentar el direccionamiento hacia células endoteliales vasculares. Se muestra a continuación una estructura representativa:



55 El riñón capta algo de la  $\alpha$ -Gal A y da como resultado un descenso significativo en los glicolípidos almacenados. Debido a que el riñón puede formar N-glucanos con residuos de GlcNac biseccionados, las células epiteliales renales puede reconocer glicoproteínas con este epítipo con una especificidad particularmente alta.

60 La actividad GnT-III elevada puede provocar un desequilibrio en la ramificación del núcleo de trimanosilo inhibiendo la ramificación adicional mediante GnT-II, IV, V y Gal  $\beta$ 1,4-transferasa al nivel del sustrato. Recientemente, se creó una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) que puede producir oligosacáridos biseccionados en glicoproteínas mediante la sobreexpresión de GnT-III recombinante. Sburlati *et al.*, Biotechnol. Progr. 14: 189-192 (1998). Se eligió el interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) como proteína heteróloga secretada terapéutica potencial y modelo sobre la que podría evaluarse el efecto de la expresión de GnT-III sobre la glicosilación del producto. Se produjo IFN- $\beta$  son oligosacáridos biseccionados mediante las células CHO modificadas por ingeniería genética con GnT-III, pero no mediante la línea celular original no modificada.

65 La producción de productos terapéuticos de glicoproteína requiere la caracterización de la glicosilación con

respecto a la regularidad lote a lote. Se ha usado la "carga Z de N-glucano hipotética" como parámetro para caracterizar la glicosilación de proteínas de una manera sencilla y eficaz. Se ha validado la determinación de Z en múltiples experimentos repetitivos y se ha probado que es sumamente precisa y fiable. Hermentin *et al.*, Glycobiology 6: 217-230 (1996). La carga de N-glucano hipotética de una glicoproteína dada se deduce a partir del perfil de mapeo de N-glucano obtenido mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC)/detección amperométrica pulsada (PAD). En la HPAEC, los N-glucanos se separan claramente según su carga, por ejemplo, su número de residuos de ácido siálico, proporcionando distintas regiones para estructuras neutras así como para los N-glucanos mono, di, tri y tetrasialilados. Z se define como la suma de los productos de las áreas respectivas (A) en la región asialo, monosialo, disialo, trisialo, tetrasialo y pentasialo, multiplicada cada una por la carga correspondiente:

$$Z = A(\text{asialo}) \cdot 0 + A(\text{MS}) \cdot 1 + A(\text{DiS}) \cdot 2 + A(\text{TriS}) \cdot 3 + A(\text{TetraS}) \cdot 4 [+ A(\text{pentaS}) \cdot 5]$$

$$Z = \sum A(i) \cdot (i)$$

en la que i es 0 en la región asialo, 1 en la región monosialo (MS), 2 en la región disialo (DiS), 3 en la región trisialo (TriS), 4 en la región tetrasialo (TetraS) y 5 en la región pentasialo (PentaS).

Por tanto, una glicoproteína con la mayoría de las estructuras C4-4\* proporcionará  $Z \cong 400$ , una glicoproteína que porta en gran parte estructuras C2-2\* ascenderá a  $Z \cong 200$  y una glicoproteína que porta sólo estructuras truncadas o de tipo con alto contenido en manosa proporcionará  $Z \cong 0$ .

Las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana descritas en el presente documento tienen una carga de oligosacáridos, tal como se mide mediante el número Z, superior a 100, preferiblemente superior a 150 y más preferiblemente superior a 170.

#### Alteración de la semivida de $\alpha$ -Gal A en suero mediante fosforilación

Puede alterarse la fosforilación de  $\alpha$ -Gal A para afectar a la semivida en circulación de  $\alpha$ -Gal A y el nivel de  $\alpha$ -Gal A que entra en las células. La fosforilación se logra preferiblemente dentro de la célula que expresa  $\alpha$ -Gal A. Se contempla específicamente obtener una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada con fosforilación aumentada introduciendo en primer lugar en una célula productora de  $\alpha$ -Gal A una secuencia de ADN que codifica para la fosforil transferasa, o introduciendo una secuencia reguladora mediante recombinación homóloga que regula la expresión de un gen de la fosforil transferasa endógena. Entonces se cultiva la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A en condiciones de cultivo que dan como resultado la expresión de  $\alpha$ -Gal A y fosforil transferasa. Entonces puede realizarse el aislamiento de la preparación de  $\alpha$ -Gal A con fosforilación aumentada en comparación con la  $\alpha$ -Gal A producida en una célula sin el polinucleótido. Tales fosforil transferasas se conocen bien en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.804.413 y 5.789.247.

Se necesitan las acciones concertadas de dos enzimas del aparato de Golgi unidas a la membrana para generar un marcador de reconocimiento de Man-6-fosfato en una proenzima lisosomal. La primera, UDP-N-acetilglucosamina: glicoproteína N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (GlcNAc fosfotransferasa), requiere un determinante de reconocimiento de proteína en enzimas lisosomales que consiste en dos residuos de lisina separados exactamente por 34 Å y en la relación espacial correcta con respecto a una cadena con alto contenido en manosa. La segunda, N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (fosfodiéster  $\alpha$ -GlcNAcasa), hidroliza la unión  $\alpha$ -GlcNAc-fosfato exponiendo el sitio de reconocimiento de Man-6-fosfato.

Las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A producidas por los procedimientos de la presente tienen múltiples glicofomas, estando entre el 16-50%, preferiblemente el 25-50%, más preferiblemente al menos el 30% de las glicofomas fosforiladas.

#### Alteración de la semivida de $\alpha$ -Gal A en suero mediante el aumento de la sialilación.

El aumento de la sialilación de los glucanos subsialilados con residuos de galactosa terminales puede lograrse mediante transfección de células de mamífero y preferiblemente humanas con el gen de la sialil transferasa.

La presente invención proporciona una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada que tiene una carga de oligosacáridos aumentada producida introduciendo en primer lugar un polinucleótido, que codifica para la sialil transferasa, en una célula productora de  $\alpha$ -Gal A, o introduciendo una secuencia reguladora mediante recombinación homóloga que regula la expresión de un gen de la sialil transferasa endógeno. Entonces se cultiva la célula de producción de  $\alpha$ -Gal A en condiciones de cultivo que dan como resultado la expresión de  $\alpha$ -Gal A y sialil transferasa. La siguiente etapa consiste en el aislamiento de la preparación de  $\alpha$ -Gal A con carga de oligosacáridos aumentada. Las sialil transferasas preferidas incluyen una  $\alpha$ 2,3-sialil transferasa y una  $\alpha$ 2,6-sialil transferasa. Estas sialil transferasas se conocen bien. Por ejemplo, véase la patente estadounidense 5.858.751.

En una realización preferida, este procedimiento de aumento de la sialilación incluye la etapa adicional de seleccionar glicoformas de la  $\alpha$ -Gal A con tamaño aumentado o carga aumentada mediante fraccionamiento o purificación de la preparación (tal como se trata a continuación).

5 Alternativamente, la sialilación puede aumentarse manteniendo las células en un entorno con bajo contenido en amonio. En particular, se obtiene una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada con aumento de la sialilación  
 10 poniendo en contacto una célula de producción de  $\alpha$ -Gal A con un medio de cultivo que tiene una concentración de amonio inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM. El aumento de la sialilación puede lograrse mediante la perfusión de células de producción mediante lo cual se retiran periódicamente metabolitos tóxicos, tales como  
 15 amoniaco, del medio de cultivo. En una realización preferida, se logra el entorno con bajo contenido en amonio mediante la adición del ADNc o gen de la glutamina sintetasa a las células de producción. Alternativamente, se logra el entorno con bajo contenido en amonio mediante la perfusión de la células de producción de  $\alpha$ -Gal A con medio de cultivo nuevo para mantener la concentración de amonio inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM. Las células de producción puede perfundirse continuamente con medio de cultivo nuevo con una concentración de amonio inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM. Alternativamente, las células de producción pueden perfundirse de manera intermitente con medio de cultivo nuevo. La perfusión intermitente, tal como se usa en el presente documento, se refiere a o bien la perfusión a intervalos regulares, periódicos de tiempo, o bien tras una medición de la concentración de amonio que se aproxima a la concentración diana (es decir, 10 mM, más preferiblemente inferior a 2 mM). Las perfusiones intermitentes deben ser a intervalos suficientemente frecuentes de modo que la concentración de amonio nunca supere la concentración diana. Las células de producción se perfunden durante un periodo de tiempo necesario para obtener una preparación de  $\alpha$ -Gal A con entre el 50-70%, preferiblemente el 60% de los glucanos totales sialilados.

#### 25 **Aumento de la semivida en circulación de $\alpha$ -Gal A en suero mediante pegilación de la $\alpha$ -Gal A**

La semivida en circulación de una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana se potencia complejando la  $\alpha$ -Gal A con polietilenglicol. El polietilenglicol (PEG) es un polímero soluble en agua que cuando se une de manera covalente a proteínas, altera sus propiedades de maneras que aumentan sus usos potenciales. La modificación con polietilenglicol ("pegilación") es una técnica bien establecida que tiene la capacidad de resolver o mejorar muchos de los problemas de productos farmacéuticos de proteínas y péptidos.

El funcionamiento farmacéutico mejorado de PEG-proteínas en comparación con sus equivalentes sin modificar originó el desarrollo de este tipo de conjugados como agente terapéutico. Las deficiencias de enzimas para las que la terapia con la enzima nativa era ineficaz (debido al rápido aclaramiento y/o reacciones inmunológicas) pueden tratarse ahora con PEG-enzimas equivalentes. Por ejemplo, la PEG-adenosina desaminasa ya ha obtenido la aprobación de la FDA. Delgado *et al.*, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9: 249-304 (1992).

La fijación covalente de PEG a la  $\alpha$ -galactosidasa de granos de café verde altera las propiedades catalíticas de la enzima enmascarando sitios de determinantes específicos en la molécula. Esto da como resultado un aumento de los valores  $K_m$  y una disminución de los de  $V_{max}$  frente a análogos de sustrato de p-nitrofenilo. Wieder & Davis, J. Appl. Biochem. 5: 337-47 (1983). La  $\alpha$ -galactosidasa todavía podía escindir residuos de galactosa terminales de sustancia B del grupo de la sangre y la saliva humana. Se perdieron la unión específica a anticuerpos y lecitina en la PEG- $\alpha$ -galactosidasa. Los anticuerpos generados a partir de la  $\alpha$ -galactosidasa nativa pueden bloquear la actividad enzimática, y esta inhibición se pierde gradualmente cuando se somete a prueba frente a preparaciones de la enzima con cantidades progresivamente superiores de PEG. En cambio, los antisueros de animales inmunizados con PEG- $\alpha$ -galactosidasa no inhibieron la actividad enzimática en ninguna preparación de  $\alpha$ -galactosidasa ni de PEG- $\alpha$ -galactosidasa. Estos resultados indican que el PEG tiende a cubrir los restos de hidratos de carbono específicos para lecitina y determinantes antigénicos y que estos sitios probablemente permanecen crípticos durante el tratamiento *in vivo* de PEG-enzimas.

La fijación covalente de PEG a proteínas requiere la activación del grupo terminal de hidroxilo del polímero con un grupo saliente adecuado que puede desplazarse mediante ataque nucleófilo del extremo  $\epsilon$ -amino-terminal de la lisina y el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal. Se han explotado varios grupos químicos para activar PEG. Para cada aplicación particular, diferentes procedimientos de acoplamiento proporcionan distintas ventajas. Diferentes procedimientos de pegilación tienen un impacto sorprendente y drástico sobre factores tales como retención de la bioactividad, estabilidad e inmunogenicidad de los péptidos y proteínas pegiladas resultantes. Francis *et al.*, Int. J. Hematol. 68(1): 1-18 (1998). Por ejemplo, una técnica de pegilación sin ligador fija sólo PEG a la molécula diana. Más específicamente, la aplicación de una técnica de pegilación biológicamente optimizada, usando tresilmonometoxi-PEG (TMPEG), a una variedad de proteínas diana revela, tal como se describe por Francis *et al.*, Int. J. Hematol. 68(1): 1-18 (1998), una capacidad excepcional para conservar la actividad biológica de la diana. Esto, y el beneficio de no añadir nada más que PEG (que se ha mostrado que es seguro para su uso en productos terapéuticos para seres humanos), a la proteína hace que el procedimiento sea ideal para la modificación de  $\alpha$ -Gal A.

65 Cuatro posibles sitios para el acoplamiento de PEG a proteínas son los (1) grupos amino (extremo N-

terminal y lisina); (2) grupos carboxilo (ácido aspártico y ácido glutámico); (3) grupos sulfhidrilo (cisteína); y (4) grupos de hidratos de carbono (aldehídos generados tras un tratamiento con peryodato). El acoplamiento a los grupos carboxilo de proteínas y a grupos aldehído sobre los hidratos de carbono requiere un reactivo de PEG con un grupo amino nucleófilo. Esta química cambia el pI de la  $\alpha$ -Gal A tras unirse los grupos carboxilo cargados negativamente mediante PEG. Cualquier cambio en el pI puede afectar a la actividad biológica de la  $\alpha$ -Gal A. Además, el acoplamiento de PEG a las cadenas de hidratos de carbono puede afectar a la captación de  $\alpha$ -Gal A por el receptor de M6P, lo que es crítico para la actividad biológica. La química con sulfhidrilo también afecta a la estructura física de la molécula y no se recomienda.

Los procedimientos comúnmente usados para la pegilación forman un puente amida entre los grupos amino de una proteína y el grupo metoxilo en monometoxi-PEG. NHS-PEG está disponible comercialmente y da como resultado un puente amida entre la proteína y PEG. Sin embargo, la formación de puentes amida cambia el pI debido a la pérdida de la carga positiva en el grupo  $\text{NH}_2$ .

Un procedimiento para acoplar PEG a  $\alpha$ -Gal A sin afectar a su pI utiliza tresil-PEG. Tresil-PEG se acopla mediante grupos amino y forma una amina secundaria estable. Las aminas secundarias ofrecen la ventaja de conservar la carga positiva del grupo amino. El reactivo de tresil-PEG está disponible comercialmente y es estable en un polvo liofilizado y desecado. Tresil-PEG se ha caracterizado extensamente y se entienden bien la reacción y los subproductos. En consecuencia, en una realización preferida, la preparación de  $\alpha$ -Gal A se compleja usando tresil-monometoxi-PEG (TMPEG) para formar una  $\alpha$ -Gal A pegilada. Entonces se purifica la  $\alpha$ -Gal A pegilada para proporcionar una  $\alpha$ -Gal A pegilada, aislada.

#### ESQUEMA DE LA REACCIÓN



↓



$\alpha$ -Gal A contiene 18 grupos amino, 17 grupos  $\epsilon$ -amino (lisina) y un grupo  $\alpha$ -amino (extremo N-terminal). La reacción puede controlarse para producir  $\alpha$ -Gal A con sustituciones mínimas y entonces las moléculas con un PEG por molécula, o un número medio menor de restos PEG por molécula, pueden purificarse de las formas no sustituidas y con sustituciones múltiples. Las sustituciones múltiples sobre  $\alpha$ -Gal A pueden no afectar significativamente a la actividad biológica; por tanto el producto final puede consistir en una mezcla heterogénea de una a 18 moléculas de PEG fijadas. El nivel de sustitución dependerá del nivel de actividad enzimática conservada. Debe observarse que una reducción de la actividad enzimática puede compensarse por un efecto terapéutico potenciado derivado de la prolongación de la semivida en circulación y la reducción del reconocimiento inmunitario de  $\alpha$ -Gal A. Por tanto, al desarrollar un producto de PEG- $\alpha$ -Gal A, la razón de PEG con respecto a  $\alpha$ -Gal A debe depender de la actividad biológica, y no únicamente de la actividad enzimática.

La reacción de pegilación requiere un control del pH, composición tampón y concentración de proteína. Pueden lograrse condiciones de reacción apropiadas mediante una etapa de ultrafiltración/diafiltración, que actualmente se usa en el procedimiento de fabricación. Inmediatamente antes de la reacción, se solubiliza rápidamente tresil-PEG en agua con agitación continua. Entonces se añade esta disolución a la  $\alpha$ -Gal A preparada y se deja reaccionar durante una cantidad de tiempo controlada y a una temperatura controlada (por ejemplo, 2 horas a 250°C). La pegilación puede producirse antes del procedimiento de purificación final, lo que eliminará añadir etapas al procedimiento de purificación. Tras completar el acoplamiento, se trata PEG- $\alpha$ -Gal A mediante las etapas restantes del procedimiento de purificación. Realizar la reacción antes de la columna Q (intercambio aniónico) permite dos etapas de purificación para eliminar los subproductos de reacción. Ya que el PEG no contiene ninguna carga negativa, no se retendrá en la Q Sepharose®, y se eluirá en el volumen inicial.

La cantidad de pegilación puede medirse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, la fluorescamina fluoresce cuando está unida a grupos  $\alpha$ -amino y  $\epsilon$ -amino de proteínas. La pérdida en porcentaje de fluorescencia tras la pegilación se correlaciona con el porcentaje de PEG unido a  $\alpha$ -Gal A. Puede usarse el ensayo BCA de Pierce para detectar la proteína total para determinar la concentración de proteína. El ensayo de actividad de metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (4-MUF- $\alpha$ -Gal) se usa para evaluar el efecto de la actividad enzimática de PEG- $\alpha$ -Gal A.  $\alpha$ -Gal A contiene M6P, lo que se requiere para su captación en lisosomas. Puede evaluarse la interferencia de PEG con el reconocimiento por el receptor de M6P usando un ensayo basado en células para monitorizar la captación de PEG- $\alpha$ -Gal A en lisosomas.

#### 60 Procedimientos de administración de una preparación de $\alpha$ -Gal A

Pueden administrarse composiciones de la presente invención mediante cualquier vía que sea compatible con la preparación de  $\alpha$ -Gal A. Puede administrarse la preparación de  $\alpha$ -Gal A purificada a individuos que producen proteína  $\alpha$ -Gal A insuficiente o defectuosa o que pueden beneficiarse de la terapia con  $\alpha$ -Gal A. Las preparaciones terapéuticas de la presente invención pueden proporcionarse a un individuo mediante cualquier medio adecuado,

directamente (por ejemplo, localmente, tal como mediante inyección, implantación o administración tópica a un sitio de tejido) o sistemáticamente (por ejemplo, por vía oral o por vía parenteral).

5 La vía de administración puede ser oral o parenteral, incluyendo intravenosa, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradérmica, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosa, transdérmica o mediante inhalación. Los procedimientos de administración intrapulmonar, aparatos y preparación de fármaco se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.785.049, 5.780.019 y 5.775.320. Un procedimiento preferido de administración intradérmica es mediante administración iontoforética mediante parches, un ejemplo de tal administración se enseña en la patente estadounidense 5.843.015.

15 Una vía de administración particularmente útil es mediante inyección subcutánea. Una preparación de  $\alpha$ -Gal A se formula de tal manera que la dosis requerida total puede administrarse en una única inyección de uno o dos mililitros. Con el fin de permitir un volumen de inyección de uno o dos mililitros, puede formularse una preparación de  $\alpha$ -Gal A a una concentración en la que la dosis preferida se administra en un volumen de uno a dos mililitros, o la preparación de  $\alpha$ -Gal A puede formularse en forma liofilizada, que se reconstituye en agua o un tampón fisiológicamente compatible apropiado antes de la administración. Las inyecciones subcutáneas de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A tienen las ventajas de ser convenientes para el paciente, en particular permitiendo la propia administración, mientras que también dan como resultado una semivida en plasma prolongada en comparación con, por ejemplo, la administración intravenosa. Una prolongación de la semivida en plasma da como resultado el mantenimiento de niveles de  $\alpha$ -Gal A en plasma eficaces a lo largo de periodos de tiempo mayores, cuyo beneficio es aumentar la exposición de tejidos clínicamente afectados a la  $\alpha$ -Gal A inyectada y, como resultado, aumentar la captación de  $\alpha$ -Gal A en tales tejidos. Esto permite un efecto más beneficioso para el paciente y/o una reducción de la frecuencia de administración. Además, puede usarse una variedad de dispositivos diseñados para la conveniencia del paciente, tales como plumas de inyección recargables y dispositivos de inyección sin aguja, con las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A tal como se tratan en el presente documento.

20 La administración puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la preparación, o puede administrarse mediante administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa de IV) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable, un órgano bioartificial o una población de células de producción de  $\alpha$ -Gal A implantadas). Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 4.407.957 y 5.798.113. Se describen procedimientos y aparatos de administración intrapulmonar, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607. Otros sistemas de administración parenteral útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, administración con bomba, administración de células encapsuladas, administración liposomal, inyección administrada con aguja, inyección sin agua, nebulizador, pulverizador, electroporación y parche transdérmico. Se describen dispositivos inyectoros sin aguja en las patentes estadounidenses 5.879.327; 5520.639; 5.846.233 y 5.704.911. Cualquiera de las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A descritas anteriormente puede administrarse en estos procedimientos.

40 La vía de administración y la cantidad de proteína administrada pueden determinarse mediante factores que caen dentro de la capacidad de evaluación del experto en la técnica. Además, los expertos en la técnica son conscientes de que la vía de administración y la dosificación de una proteína terapéutica pueden variarse para un paciente dado hasta que se obtiene un nivel de dosificación terapéutico.

#### 45 **Formulación farmacéutica de proteína $\alpha$ -Gal A**

50 Se proporcionan además formulaciones de una preparación de  $\alpha$ -Gal A que están sustancialmente libres de proteínas distintas de  $\alpha$ -Gal A, tales como albúmina, proteínas distintas de  $\alpha$ -Gal A producidas por la célula huésped o proteínas aisladas de fluido o tejido animal.

55 La preparación comprende preferiblemente parte de una disolución o suspensión de fluido acuosa o fisiológicamente compatible. El soporte o vehículo es fisiológicamente compatible de manera que, además de administrar la preparación deseada al paciente, no afecta adversamente de otro modo al equilibrio de electrolito y/o volumen del paciente. Las disoluciones útiles para la administración parenteral pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990. También pueden usarse formulaciones no parenterales, tales como supositorios y formulaciones orales.

60 Preferiblemente la formulación contiene un excipiente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para  $\alpha$ -Gal A que pueden incluirse en la formulación son tampones tales como tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tales como albúmina sérica, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro de sodio; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Los sistemas de tampón para su uso

65

con preparaciones de  $\alpha$ -Gal A incluyen tampones citrato; acetato; bicarbonato; y fosfato (todos disponibles de Sigma). El tampón fosfato es una realización preferida. Un intervalo de pH preferido para preparaciones de  $\alpha$ -Gal A es de pH 4,5-7,4.

5 La formulación también contiene preferiblemente un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos preferidos incluyen Polisorbato 20, Polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, Octil- $\alpha$ -glucósido, Octil- $\beta$ -glucósido, Brij 35, Pluronic y Tween 20 (todos disponibles de Sigma).

10 Una formulación particularmente preferida contiene detergente no iónico polisorbato 20 o polisorbato 80 y solución salina tamponada con fosfato, lo más preferiblemente a pH 6.

15 Para la liofilización de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A, la concentración de proteína puede ser de 0,1-10 mg/ml. Pueden añadirse agentes de carga, tales como glicina, manitol, albúmina y dextrano, a la mezcla de liofilización. Además, pueden añadirse posibles crioprotectores, tales como disacáridos, aminoácidos y PEG a la mezcla de liofilización. También puede añadirse cualquiera de los tampones, excipientes y detergentes enumerados anteriormente.

En una formulación preferida la  $\alpha$ -Gal A para inyección está a una concentración de 1 mg/ml.

20 Las formulaciones para su administración pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad para ayudar a mantener el agente en el sitio deseado. Los polímeros biocompatibles, preferiblemente polímeros biocompatibles, bioerosionables, (incluyendo, por ejemplo, polímeros de ácido hialurónico, colágeno, polibutirato, lactida y glicolida, y copolímeros de lactida/glicolida) pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación del agente *in vivo*. Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir glicocolato para la administración bucal, metoxisalicilato para la administración rectal o ácido cítrico para la administración vaginal. Pueden prepararse supositorios para la administración rectal mezclando una preparación de  $\alpha$ -Gal A con un excipiente no irritante tal como manteca de cacao u otras composiciones que son sólidas a temperatura ambiente y líquidas a la temperatura corporal.

30 Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener lactosa u otros excipientes, o pueden ser disoluciones acuosas que pueden contener polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato o desoxicocolato. Un aerosol de inhalación preferido se caracteriza por tener partículas de pequeña densidad de masa y gran tamaño. Las partículas con densidades de masa inferiores a 0,4 gramos por centímetro cúbico y diámetros medios superiores a 5  $\mu$ m administran eficazmente productos terapéuticos inhalados a la circulación sistémica. Tales partículas se inspiran de manera profunda en los pulmones y escapan a los mecanismos de aclaramiento natural de los pulmones hasta que las partículas inhaladas administran su carga terapéutica. (Edwards *et al.*, Science 276: 1868-1872 (1997)). Pueden administrarse preparaciones de  $\alpha$ -Gal A en forma de aerosol, por ejemplo, usando procedimientos de preparación y formulaciones tal como se describe en las patentes estadounidenses 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607. La formulación para administración intranasal puede incluir disoluciones aceitosas para su administración en forma de gotas nasales, o como gel para aplicarse por vía intranasal.

45 Las formulaciones para administración tópica a la superficie de la piel pueden prepararse dispersando la preparación de  $\alpha$ -Gal A con un soporte dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, pomada o jabón. Son particularmente útiles los soportes que pueden formar una película o capa sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir su eliminación. Para la administración tópica a superficies de tejido internas, la preparación de  $\alpha$ -Gal A puede dispersarse en un adhesivo tisular líquido u otra sustancia que se sabe que potencia la adsorción a una superficie de tejido. Por ejemplo, se han descrito diversos adhesivos mucosos y comprimidos bucales para la administración transmucosa de fármacos, tales como en las patentes estadounidenses 4.740.365, 4.764.378 y 5.780.045. También pueden incorporarse disoluciones de hidroxipropilcelulosa o fibrinógeno/trombina. Alternativamente, pueden usarse disoluciones de recubrimiento de tejidos, tales como formulaciones que contienen pectina.

55 Las preparaciones de la invención pueden proporcionarse en recipientes adecuados para mantener la esterilidad, proteger la actividad de los principios activos durante su distribución y almacenamiento apropiados y proporcionar una accesibilidad conveniente y eficaz de la preparación para su administración a un paciente. Puede suministrarse una formulación inyectable de una preparación de  $\alpha$ -Gal A en un vial con tapón adecuado para extraer el contenido usando una aguja y una jeringuilla. El vial estará previsto o bien para un único uso o bien para múltiples usos. La preparación también puede suministrarse como una jeringuilla precargada. En algunos casos, el contenido se suministrará en una formulación líquida, mientras que en otros se suministrará en un estado seco o liofilizado, que en algunos casos requerirá su reconstitución con un diluyente convencional o suministrado para dar un estado líquido. Cuando la preparación se suministra como un líquido para su administración intravenosa, puede proporcionarse en una bolsa estéril o recipiente adecuado para su conexión a un catéter o línea de administración intravenosa. En realizaciones preferidas, las preparaciones de la invención se suministran o bien en formulaciones líquidas o bien en polvo en dispositivos que administran de manera conveniente una dosis predeterminada de la preparación; ejemplos de tales dispositivos incluyen inyector sin aguja para inyección o bien subcutánea o bien

intramuscular, y un dispositivo de administración por aerosol medido. En otros casos, la preparación puede suministrarse en una forma adecuada para su liberación sostenida, tal como en un parche o apósito para aplicarse a la piel para su administración transdérmica, o mediante dispositivos erosionables para su administración transmucosa. En casos en los que la preparación se administra por vía oral en forma de comprimido o pastilla, la preparación puede suministrarse en una botella con una cubierta desmontable. Los recipientes pueden etiquetarse con información tal como el tipo de preparación, el nombre del fabricante o distribuidor, la indicación, la dosificación sugerida, instrucciones para su almacenamiento apropiado o instrucciones para su administración.

#### Dosificaciones para la administración de una preparación de $\alpha$ -Gal A

La presente divulgación proporciona además procedimientos para administrar una preparación de  $\alpha$ -Gal A a un paciente con enfermedad de Fabry, una variante atípica de la enfermedad de Fabry o cualquier estado en el que esté presente un nivel reducido o una forma mutante de  $\alpha$ -Gal A. La dosis de administración es preferiblemente de 0,05-5,0 mg, más preferiblemente de entre 0,1-0,3 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kilogramo de peso corporal y se administra semanal o quincenalmente. En una realización preferida, se administra quincenalmente una dosis de aproximadamente 0,2 mg/kg. Se necesitan dosis regularmente repetidas de la proteína a lo largo de la vida del paciente. Pueden usarse inyecciones subcutáneas para mantener una exposición sistémica a mayor plazo al fármaco. La dosificación subcutánea puede ser de entre 0,01-10,0 mg, preferiblemente de 0,1-5,0 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kg de peso corporal quincenal o semanalmente. Las dosificaciones de preparaciones de  $\alpha$ -Gal A que se administran mediante inyecciones intramusculares pueden ser las mismas o diferentes de las inyectadas por vía subcutánea; en una realización preferida, las dosificaciones intramusculares son inferiores y se administran con menor frecuencia. La preparación de  $\alpha$ -Gal A también puede administrarse por vía intravenosa, por ejemplo, en una inyección en bolo intravenosa, en una inyección intravenosa de empuje lento, o mediante inyección intravenosa continua. La infusión i.v. continua (por ejemplo, a lo largo de 2-6 horas) permite el mantenimiento de niveles específicos en la sangre.

Un procedimiento preferido alternativo para administrar una preparación de  $\alpha$ -Gal A a un paciente implica administrar semanal o quincenalmente una dosis preferida de una preparación de  $\alpha$ -Gal A durante un periodo de varios años, por ejemplo, hasta tres años, tiempo durante el cual se monitoriza clínicamente a un paciente para evaluar el estado de su enfermedad. Puede usarse la mejora clínica medida mediante, por ejemplo, mejora en la función renal o cardíaca o bienestar global del paciente (por ejemplo, dolor), y mejora de laboratorio medida mediante, por ejemplo, reducciones en los niveles de CTH en orina, plasma o tejido, para evaluar el estado de salud del paciente. En el caso de que se observe una mejora clínica tras este periodo de tratamiento y monitorización, puede reducirse la frecuencia de administración de  $\alpha$ -Gal A. Por ejemplo, un paciente que recibe inyecciones semanales de una preparación de  $\alpha$ -Gal A puede cambiar a inyecciones quincenales. Alternativamente, un paciente que recibe inyecciones quincenales de una preparación de  $\alpha$ -Gal A puede cambiar a inyecciones mensuales. Tras un cambio de este tipo en la frecuencia de la dosificación, debe monitorizarse al paciente durante otros varios años, por ejemplo, un periodo de tres años, con el fin de evaluar medidas clínicas y de laboratorio relacionadas con la enfermedad de Fabry. En una realización preferida, la dosis administrada no cambia si se realiza un cambio en la frecuencia de la dosificación. Esto garantiza que ciertos parámetros farmacocinéticos (por ejemplo concentración máxima en plasma [ $C_{max}$ ], tiempo hasta la concentración máxima en plasma [ $t_{max}$ ], plasma, semivida [ $t_{1/2}$ ] y exposición según se miden mediante el área bajo la curva [AUC]) permanecen relativamente constantes tras cada dosis administrada. El mantenimiento de estos parámetros farmacocinéticos dará como resultado niveles relativamente constantes de captación de  $\alpha$ -Gal A mediada por el receptor en tejidos a medida que cambian las frecuencias de la dosis.

A un paciente con variante atípica de la enfermedad de Fabry, por ejemplo, que muestra anomalías predominantemente cardiovasculares o afectación renal, se le trata con estos mismos regímenes de dosificación, es decir, desde 0,05 mg/kg hasta 5 mg/kg semanal o quincenalmente. La dosis se ajusta según se necesite. Por ejemplo, un paciente con el fenotipo de variante cardíaca a quién se le trata con terapia sustitutiva con enzima  $\alpha$ -galactosidasa A tendrá un cambio en la composición de su corazón y una mejora de la función cardíaca tras la terapia. Este cambio puede medirse con ecocardiografía convencional que puede detectar el aumento del espesor de la pared del ventrículo izquierdo en pacientes con enfermedad de Fabry (Goldman *et al.*, J Am Coll Cardiol 7: 1157 - 1161 (1986)). Pueden realizarse mediciones ecocardiográficas en serie del espesor de la pared del ventrículo izquierdo durante la terapia, y una reducción del tamaño de la pared del ventrículo es indicativa de una respuesta terapéutica. A los pacientes que se someten a terapia sustitutiva con enzima  $\alpha$ -gal A también se les puede realizar un seguimiento con formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) cardíaca. La IRM tiene la capacidad para evaluar la composición relativa de un tejido dado. Por ejemplo, la IRM cardíaca en pacientes con enfermedad de Fabry revela lípidos depositados dentro del miocardio en comparación con pacientes control (Matsui *et al.*, Am Heart J 117: 472 - 474. (1989)). Evaluaciones por IRM cardíaca en serie en un paciente que se somete a terapia sustitutiva con enzima pueden revelar un cambio en la deposición de lípidos dentro del corazón de un paciente. Los pacientes con el fenotipo de variante renal también pueden beneficiarse de la terapia sustitutiva con enzima  $\alpha$ -galactosidasa A. También puede medirse el efecto de la terapia mediante pruebas convencionales de la función renal, tales como nivel de proteínas en orina de 24 horas, aclaramiento de creatinina y tasa de filtración glomerular. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la

invención.

### Ejemplo 1 Preparación y uso de constructos diseñados para administrar y expresar $\alpha$ -Gal A

5 Se construyeron dos plásmidos de expresión, pXAG-16 y pXAG-28. Estos plásmidos contienen ADNc de  $\alpha$ -Gal A humana que codifica para los 398 aminoácidos de la enzima  $\alpha$ -Gal A (sin el péptido señal de  $\alpha$ -Gal A); la secuencia de ADN genómico del péptido señal de la hormona de crecimiento humana (hGH), que está interrumpida por el primer intrón del gen de la hGH; y la secuencia no traducida en 3' (UTS) del gen de la hGH, que contiene una señal para la poliadenilación. El plásmido pXAG-16 tiene el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (CMV IE) y el primer intrón (flanqueado por secuencias de exones no codificantes), mientras que pXAG-28 está impulsado por el promotor I $\alpha$ 2 del colágeno y el exón 1, y también contiene la UTS en 5' del gen de la  $\beta$ -actina, que contiene el primer intrón del gen de la  $\beta$ -actina.

#### 15 1.1 Clonación del ADNc completo de la $\alpha$ -Gal A y construcción del plásmido de expresión de $\alpha$ -Gal A pXAG-16

Se clonó el ADNc de la  $\alpha$ -Gal humana a partir de una biblioteca de ADNc de fibroblastos humanos que se construyó tal como sigue. Se aisló ARNm de poli-A<sup>+</sup> a partir de ARN total, y se realizó la síntesis de ADNc usando reactivos del sistema Lambda ZapII® según las instrucciones del fabricante (Stratagene Inc., La Jolla, CA). En resumen, se generó ADNc de "primera cadena" mediante transcripción inversa en presencia de un cebador de oligo-dT que contenía el sitio de endonucleasa de restricción XhoI interno. Tras el tratamiento con ARNasa H, se realizó el traslado de mechas del ADNc con ADN polimerasa I para generar ADNc bicatenario. Se hicieron romos los extremos de este ADNc con ADN polimerasa de T4, y se ligó con adaptadores de EcoRI. Se trataron los productos de esta ligación con ADN cinasa de T4 y se digirieron con XhoI. Se fraccionó el ADNc mediante cromatografía con Sephacryl®-400. Se combinaron las fracciones de tamaño grande y medio y se ligaron los ADNc a brazos de Lambda ZapII digeridos con EcoRI y XhoI. Entonces se envasaron y titularon los productos de esta ligación. La biblioteca primaria tenía un título de  $1,2 \times 10^7$  ufp/ml y un tamaño de inserto promedio de 925 pb.

Se usó una sonda de 210 pb a partir del exón 7 del gen de la  $\alpha$ -Gal A humana (figura 1, SEQ ID NO: 1) para aislar el ADNc. Se aisló la propia sonda usando ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes oligonucleótidos: 5'-CTGGGCTGTAGCTATGATAAAC-3' (Oligo 1; SEQ ID NO: 6) y 5'-TCTAGCTGAAGCAAACAGTG-3' (Oligo 2; SEQ ID NO: 7). Entonces se usó el producto de PCR para explorar la biblioteca de ADNc de fibroblastos, y se aislaron los clones positivos y se caracterizaron adicionalmente. Se sometió un clon positivo, el fago 3A, al protocolo de escisión con el sistema Lambda ZapII® (Stratagene, Inc., La Jolla, CA), según las instrucciones del fabricante. Este procedimiento proporcionó el plásmido pBSAG3A, que contiene la secuencia de ADNc de la  $\alpha$ -Gal A en el esqueleto del plásmido pBluescriptSK-™. La secuenciación de ADN reveló que este plásmido no contenía el extremo en 5' completo de la secuencia de ADNc. Por tanto, se reconstruyó el extremo en 5' usando un fragmento de PCR amplificado a partir de ADN genómico humano. Para lograr esto, se amplificó un fragmento de ADN genómico de 268 pb (figura 2, SEQ ID NO: 2) usando los siguientes oligonucleótidos: 5'-ATTGGTCCGCCCTGAGGT-3' (Oligo 3; SEQ ID NO: 8) y 5'-TGATGCAGGAATCTGGCTCT-3' (Oligo 4; SEQ ID NO: 9). Se subclonó este fragmento en un plásmido de clonación "TA" (Invitrogen Corp., San Diego, CA) para generar plásmido pTAAGEI. El plásmido pBSAG3A, que contiene la mayor parte de la secuencia de ADNc de la  $\alpha$ -Gal A, y pTAAGEI, que contiene el extremo en 5' del ADNc de la  $\alpha$ -Gal A, se digirieron cada uno con SacII y NcoI. Las posiciones de los sitios de SacII y NcoI relevantes dentro del fragmento de ADN amplificado se muestran en la figura 2. Se aisló el fragmento de SacII-NcoI de 0,2 kb a partir de pTAAGEI y se ligó con pBSAG3A digerido de manera equivalente. Este plásmido, pAGAL, contiene la secuencia de ADNc de la  $\alpha$ -Gal A completa, incluyendo la secuencia que codifica para el péptido señal de la  $\alpha$ -Gal A. Se secuenció completamente el ADNc (mostrado en la figura 3 incluyendo el péptido señal de la  $\alpha$ -Gal A; SEQ ID NO: 3) y se encontró que era idéntico a la secuencia publicada para el ADNc de la  $\alpha$ -Gal A humana (secuencia de Genbank HUMGALA).

Se construyó el plásmido pXAG-16 mediante varios productos intermedios, tal como sigue. En primer lugar, se digirió pAGAL con SacII y XhoI y se hicieron romos sus extremos. En segundo lugar, se ligaron los extremos del ADNc completo de la  $\alpha$ -Gal A con ligadores XbaI y se subclonó en pEF-BOS digerido con XbaI (Mizushima *et al.*, Nucl. Acids Res. 18: 5322, 1990), creando pXAG-1. Este constructo contiene la UTS en 3' del factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF) y el promotor del factor de elongación humano-1a (EF-1a) que flanquea al ADNc que codifica para la  $\alpha$ -Gal A más el péptido señal de la  $\alpha$ -Gal A, de tal manera que el extremo en 5' del ADNc de la  $\alpha$ -Gal A está fusionado al promotor de EF-1a. Para crear un constructo con el promotor CMV IE y el primer intrón, el ADNc de la  $\alpha$ -Gal A y UTS en 3' de G-CSF se retiró de pXAG-1 como un fragmento de XbaI-BamHI de 2 kb. Se hicieron romos los extremos del fragmento, se ligó con ligadores BamHI y se insertó en pCMVflpNeo digerido con BamHI (que se construyó tal como se describe a continuación). La orientación fue tal que el extremo en 5' del ADNc de la  $\alpha$ -Gal A estaba fusionado a la región del promotor CMV IE.

Se creó pCMVflpNeo tal como sigue. Se amplificó un fragmento del promotor del gen CMV IE mediante PCR usando ADN genómico de CMV como molde y los oligonucleótidos: 5'-TTTTGGATCCCTCGAGGACATTGATTATTGACTAG-3' (SEQ ID NO: 10) y 5'-

TTTTGGATCCCGTGTCAAGGACGGTGAC-3' (SEQ ID NO: 11). Se digirió el producto resultante (un fragmento de 1,6 kb) con BamHI, dando un fragmento que contenía el promotor de CMV con extremos cohesivos digeridos con BamHI. Se aisló la unidad de expresión neo del plásmido pMC1neoPA (Stratagene Inc., La Jolla, CA) como un fragmento de XhoI-BamHI de 1,1 kb. Se insertaron los fragmentos neo y el que contenía el promotor de CMV en un plásmido digerido con BamHI y XhoI (pUC12). Notablemente, pCMVfIpNeo contiene la región de promotor CMV IE, que comienza en el nucleótido 546 y termina en el nucleótido 2105 (de la secuencia de Genbank HS5MIEP), y el gen de la neomicina impulsado por el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple (VHS) (el gen TKneo) inmediatamente en 5' con respecto al fragmento de promotor CMV IE. La dirección de transcripción del gen *neo* es la misma que la del fragmento de promotor CMV. Este constructo intermedio se denominó pXAG-4.

Para añadir la UTS en 3' de la hGH, la UTS en 3' del GCSF se retiró de pXAG-4 como un fragmento de XbaI-SmaI y se hicieron romos los extremos de pXAG-4. La UTS en 3' de la hGH se retiró de pXGH5 (Selden *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 3173-3179, 1986) como un fragmento de SmaI-EcoRI de 0,6 kb. Tras hacer romos los extremos de este fragmento, se ligó en pXAG-4 inmediatamente después el sitio XbaI de extremos romos de pXAG-4. Este producto intermedio se denominó pXAG-7. Se retiró el fragmento de TKneo de este plásmido como un fragmento de HindIII-ClaI y se hicieron romos los extremos del plásmido "completando" con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. Se ligó un gen de resistencia a la neomicina impulsado por el promotor temprano del SV40 como un fragmento de ClaI-BsmBI romo de un digesto de pcDNeo (Chen *et al.*, Mol. Cell. Biol. 7: 2745-2752, 1987), colocando la unidad de transcripción neo en la misma orientación que la unidad de transcripción de  $\alpha$ -Gal A. Este producto intermedio se denominó pXAG-13.

Para completar pXAG-16, que tiene la secuencia que codifica para el péptido señal de la hGH de 26 aminoácidos y el primer intrón del gen de la hGH, se retiró en primer lugar un fragmento de EcoRI-BamHI de 2,0 kb de pXAG-13. Este fragmento incluía el ADNc de la  $\alpha$ -Gal A y la UTS en 3' de la hGH. Se sustituyó este fragmento grande por 3 fragmentos. El primer fragmento consistía en un producto de PCR de 0,3 kb de pXGH5, que contiene la secuencia que codifica para el péptido señal de la hGH e incluye la secuencia del primer intrón de la hGH, desde un sitio BamHI sintético situado justo en sentido 5' de la secuencia consenso Kozak hasta el extremo de la secuencia que codifica para el péptido señal de la hGH. Se usaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar este fragmento (fragmento 1): 5'-TTTTGGATCCACCATGGCTA-3' (Oligo HGH101; SEQ ID NO: 12) y 5'-TTTTGCCGGCACTGCCCTCTTGAA-3' (Oligo HGH102; SEQ ID NO: 13). El segundo fragmento consistía en un producto de PCR de 0,27 kb que contiene secuencias correspondientes al inicio del ADNc que codifica para la enzima  $\alpha$ -Gal A de 398 aminoácidos (es decir, que carece del péptido señal de la  $\alpha$ -Gal A) hasta el sitio NheI. Se usaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar este fragmento (fragmento 2): 5'-TTTTCAGCTGGACAATGGATTGGC-3' (Oligo AG10; SEQ ID NO: 14) y 5'-TTTTGCTAGCTGGCGAATCC-3' (Oligo AG11; SEQ ID NO: 15). El tercer fragmento consistió en el fragmento de NheI-EcoRI de pXAG-7 que contiene el resto de la secuencia de  $\alpha$ -Gal A así como la UTS en 3' de la hGH (fragmento 3).

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

## 1.2 Construcción del plásmido de expresión de la $\alpha$ -Gal A pXAG-28

Se aisló el promotor de  $\alpha 2$  del colágeno humano para su uso en el constructo de expresión de la  $\alpha$ -Gal A pXAG-28 tal como sigue. Se aisló un fragmento de PCR de 408 pb de ADN genómico humano que contiene parte del promotor  $\alpha 2$  del colágeno humano usando los siguientes oligonucleótidos:

5'-TTTTGGATCCCGTGTCCCATAGTGTTCCTCAA-3' (Oligo 72; SEQ ID NO: 16) y  
5'-TTTTGGATCCGCAGTCGTGGCCAGTACC-3' (Oligo 73; SEQ ID NO: 17).

Se usó este fragmento para explorar una biblioteca de leucocitos humanos en EMBL3 (Clontech Inc., Palo Alto, CA). Se aisló un clon positivo (fago 7H) que contenía un fragmento de EcoRI de 3,8 kb y se clonó en pBSIISK+ (Stratagene Inc., La Jolla, CA) en el sitio EcoRI (creando pBS/7H.2). Se introdujo un sitio AvrII en pBSIISK+ digiriendo con SpeI, que escinde dentro del poliligador pBSIISK+, "completando" con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I e insertando el oligonucleótido 5'-CTAGTCCTAGGA-3' (SEQ ID NO: 18). Se digirió esta variante de pBSIISK+ con BamHI y AvrII y se ligó al fragmento de BamHI-AvrII de 121 pb del fragmento de PCR del promotor  $\alpha 2$  del colágeno de 408 pb original descrito anteriormente, creando pBS/121COL.6.

Se digirió el plásmido pBS/121COL.6 con XbaI, que escinde dentro de la secuencia de poliligador de pBSIISK+, se "completó" con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y se digirió con AvrII. Se aisló el fragmento de BamHI-AvrII de 3,8 kb de pBS/7H.2 y se hicieron romos los extremos del sitio BamHI mediante tratamiento con la enzima Klenow. Entonces se digirió el fragmento con AvrII y se ligó al vector digerido con AvrII, creando así el plásmido de promotor del colágeno pBS/121bpCOL7H.18.

A continuación se fusionó el promotor del colágeno a la UTS en 5' del gen de la  $\beta$ -actina humano, que

contiene el primer intrón del gen de la  $\beta$ -actina humano. Para aislar esta secuencia, se aisló un fragmento de PCR de 2 kb a partir de ADN genómico humano usando los siguientes oligonucleótidos:

5 5'-TTTTGAGCACAGAGCCTCGCCT-3' (Oligo BA1; SEQ ID NO: 19) y  
5'-TTTTGGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCC-3' (Oligo BA2; SEQ ID NO: 20).

10 Se digirió este fragmento con BamHI y BsiHKAI para liberar un fragmento de 0,8 kb que contiene el intrón y la UTS en 5' de la  $\beta$ -actina. Entonces se aisló un fragmento de Sall-SrfI de 3,6 kb a partir del plásmido promotor del colágeno pBS/121bpCOL7H.18 tal como sigue. Se digirió parcialmente pBS/121bpCOL7H.18 con BamHI (el sitio BamHI se encuentra en el extremo 5' del fragmento del promotor  $\text{I}\alpha 2$  del colágeno), se hicieron romos sus extremos mediante tratamiento con el fragmento Klenow y se ligó a un ligador de Sall (5'-GGTCGACC-3'), colocando así un sitio Sall en sentido 5' del promotor  $\text{I}\alpha 2$  del colágeno. Entonces se digirió este plásmido con Sall y SrfI (el sitio SrfI se encuentra 110 pb en sentido 5' del sitio CAP del promotor  $\text{I}\alpha 2$  del colágeno), y se aisló el fragmento de 3,6 kb. Se combinaron los fragmentos de 0,8 y 3,6 kb con pBSISK digerido con Sall y BamHI (Stratagene Inc., La Jolla, CA), y un fragmento compuesto por los cuatro siguientes oligonucleótidos hibridados juntos (formando un fragmento con un extremo romo y un extremo de BsiHKAI):

20 5'-GGGCCCCCAGCCCCAGCCCTCCATTGGTGGAGGCCCTTTTGGAGGCACCCTAGGGCCAGGAACTTTTGC  
CGTAT-3' (Oligo COL-1; SEQ ID NO: 21),  
5'-AAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTAGCACCACGGCCGCCGAGACCGCGTCCGCCCCGCGAGCA-3'  
(Oligo COL-2; SEQ ID NO: 22),  
5'-TGCCCTATTATACGGCAAAGTTTCTGGCCCTAGGGTGCCTCCAAAAGGGCTCCACCAATGGGAGGGC  
TGGGGCTGGGGGCC-3' (Oligo COL-3; SEQ ID NO: 23), y  
25 5'-CGCGGGGCGGACGCGGTCTCGGCGCCGTGGTGCTAAAAATAAAGCCCGGATC-3' (Oligo COL-4; SEQ ID  
NO: 24).

30 Estos cuatro oligonucleótidos, cuando se hibridan, corresponden a la región que comienza en el sitio SrfI del promotor del colágeno y continúa a través del sitio BsiHKAI del promotor de la  $\beta$ -actina. El plásmido resultante se denominó pCOL/ $\beta$ -actina.

35 Para completar la construcción de pXAG-28, se aisló el fragmento de Sall-BamHI de pCOL/ $\beta$ -actina, que contiene el promotor  $\text{I}\alpha 2$  del colágeno y la UTS en 5' de la  $\beta$ -actina. Se ligó este fragmento a dos fragmentos de pXAG-16 (véase el ejemplo 1,1 y la figura 4): (1) el fragmento de BamHI de 6,0 kb (que contiene el gen *neo*, esqueleto de plásmido, el ADN que codifica para la enzima  $\alpha$ -Gal A de 398 aminoácidos y la UTS en 3' de la hGH); y (2) el fragmento de BamHI-XhoI de 0,3 kb (que contiene la secuencia de poli-A de SV40 de pcDneo). pXAG-28 contiene el promotor  $\text{I}\alpha 2$  del colágeno humano fusionado a la UTS en 5' de la  $\beta$ -actina humana, el péptido señal de la hGH (que está interrumpido por el primer intrón de la hGH), el ADNc que codifica para la enzima  $\alpha$ -Gal A, y la UTS en 3' de la hGH. En la figura 5 se muestra un mapa del constructo de expresión completado pXAG-28.

### 40 1.3 Transfección y selección de fibroblastos sometidos a electroporación con plásmidos de expresión de la $\alpha$ -Gal A

45 Con el fin de expresar  $\alpha$ -Gal A en fibroblastos, se cultivaron fibroblastos secundarios y se transfectaron según procedimientos publicados (Selden *et al.*, documento WO 93/09222).

50 Se transfectaron mediante electroporación los plásmidos pXAG-13, pXAG-16 y pXAG-28 en fibroblastos de prepucio humano para generar cepas de células clonales transfectadas de manera estable, y se monitorizaron los niveles de expresión de  $\alpha$ -Gal A resultantes tal como se describe en el ejemplo 1.4. La secreción de  $\alpha$ -Gal A por fibroblastos de prepucio normales está en el intervalo de 2-10 unidades/ $10^6$  células/24 horas. En cambio, los fibroblastos transfectados presentaron niveles medios de expresión tal como se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2**  
**Niveles medios de expresión de  $\alpha$ -Gal A ( $\pm$  desviación estándar)**

55	pXAG-13:	420 $\pm$ 344 U/ $10^6$ células/día N=26 cepas clonales (intervalo 3 - 1133 U/ $10^6$ células/día)
	pXAG-16:	2,051 $\pm$ 1253 U/ $10^6$ células/día N=24 cepas clonales (intervalo 422 - 5200 U/ $10^6$ células/día)
60	pXAG-28:	141 $\pm$ 131 U/ $10^6$ células/día N=38 cepas clonales (intervalo 20 - 616 U/ $10^6$ células/día)

65 Estos datos muestran que los tres constructos de expresión pueden aumentar la expresión de  $\alpha$ -Gal A

muchas veces la de fibroblastos no transfectados. La expresión por fibroblastos transfectados de manera estable con pXAG-13, que codifica para  $\alpha$ -Gal A unido al péptido señal de la  $\alpha$ -Gal A, fue sustancialmente inferior a la expresión por fibroblastos transfectados con pXAG-16, que se diferencia sólo en que el péptido señal es el péptido señal de la hGH, cuya secuencia codificante está interrumpida por el primer intrón del gen de la hGH.

Cada vez que se hicieron pasar las células transfectadas, se determinó la actividad de  $\alpha$ -Gal A secretada, se contaron las células y se calculó la densidad celular. Basándose en el número de células recogidas y el tiempo permitido para la secreción de  $\alpha$ -Gal A, se determinó la tasa de expresión específica de  $\alpha$ -Gal A y se notifica en las tablas 3 y 4 como unidades secretadas (de  $\alpha$ -Gal A) por  $10^6$  células por periodo de 24 horas. Las cepas celulares deseables para la terapia génica o para su uso en la generación de material para la purificación de  $\alpha$ -Gal A deben presentar una expresión y crecimiento estables a lo largo de varios pases. Los datos de las cepas celulares mostrados en las tablas 3 y 4, que se transfectaron de manera estable con el constructo de expresión de la  $\alpha$ -Gal A pXAG-16, ilustran el hecho de que la expresión de la  $\alpha$ -Gal A se mantiene de manera estable durante los pases en serie.

**Tabla 3**  
**Crecimiento y expresión de células BRS-11 que contienen el constructo de expresión de la  $\alpha$ -Gal A pXAG-16**

Pase	Expresión (unidades/ $10^6$ células/24 h)	Densidad celular (células/cm <sup>2</sup> )
13	2601	$4,80 \times 10^4$
14	1616	$4,40 \times 10^4$
15	3595	$4,40 \times 10^4$

**Tabla 4**  
**Crecimiento y expresión de células HF503-242 que contienen el constructo de expresión de la  $\alpha$ -Gal A P<sub>X</sub>AG-16**

Pase	Expresión (unidades/ $10^6$ células/24 h)	Densidad celular (células/cm <sup>2</sup> )
5	4069	$2,80 \times 10^4$
6	7585	$3,55 \times 10^4$
7	5034	$2,48 \times 10^4$

#### 1.4 Cuantificación de la expresión de la $\alpha$ -Gal A

Se midió la actividad de la  $\alpha$ -Gal A usando el sustrato soluble en agua 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (4-MUF-gal; Research Products, Inc.) mediante una modificación del protocolo descrito por Ioannou *et al.*, J. Cell Biol. 119: 1137-1150 (1992). Se disolvió el sustrato en tampón sustrato (citrate-fosfato 0,1 M, pH 4,6) hasta una concentración de 1,69 mg/ml (5 mM). Normalmente, se añadieron 10 ml de sobrenadante de cultivo a 75 ml de la disolución de sustrato. Se cubrieron los tubos y se dejó incubar en un baño de agua a 37°C durante 60 minutos. Al final del periodo de incubación, se usaron 2 ml de tampón glicina-carbonato (glicina 130 mM, carbonato de sodio 83 mM, a pH 10,6), para detener la reacción. Se midió la fluorescencia relativa de cada muestra usando un fluorómetro modelo TKO100 (Hoefer Scientific Instruments) que tiene una longitud de onda de excitación fijada de 365 nm y detecta una longitud de onda de emisión fijada de 460 nm. Se compararon las lecturas de las muestras con patrones preparados a partir de una disolución madre 1 mM de metilumbeliferona (Sigma Chemical Co.), y se calculó la cantidad de sustrato hidrolizado. La actividad de  $\alpha$ -Gal A se expresa en unidades; una unidad de actividad de  $\alpha$ -Gal A equivale a un nanomol de sustrato hidrolizado por hora a 37°C. Los datos de expresión celular se expresan generalmente como unidades de actividad de  $\alpha$ -Gal A secretadas/ $10^6$  células/24 horas. También se usó este ensayo para medir la cantidad de actividad de  $\alpha$ -Gal en lisados celulares y en muestras de diversas etapas de purificación de  $\alpha$ -Gal, tal como se trata a continuación.

#### 1.5 Preparación de $\alpha$ -Gal A activada por genes (GA-GAL)

La producción de  $\alpha$ -Gal A activada por genes (GA-GAL) se produjo mediante inserción de secuencias de ADN reguladoras y estructurales en sentido 5' de la secuencia que codifica para la  $\alpha$ -Gal A humana, usando la tecnología de GA sustancialmente tal como se describe en la patente estadounidense número 5.733.761.

La inserción precisa de la secuencia activadora de genes se produce como resultado de la recombinación homóloga entre ADN presente en un fragmento de ADN transfectado y secuencias de ADN genómico en sentido 5' del locus de la  $\alpha$ -Gal A en una célula humana. La propia secuencia de activación de genes contiene la secuencia que codifica para la  $\alpha$ -Gal A hasta, pero sin incluir, el sitio de escisión del péptido señal. Se aislaron células que contenían un locus de  $\alpha$ -Gal A activada y se sometieron a selección con fármacos para aislar células con una producción aumentada de GA-GAL.

Se introdujo un fragmento de ADN de selección como diana que contenía una secuencia de activación de

genes apropiada en líneas de células humanas huéspedes mediante electroporación. Una de tales líneas celulares es HT-1080, una línea celular certificada disponible de la ATCC (Rockville, Maryland). En la figura 9 se muestra el plásmido de activación de genes (constructo de selección como diana) pGA213C que contiene un fragmento de ADN de este tipo. Este plásmido contiene secuencias diseñadas para activar una parte del locus de  $\alpha$ -Gal A endógeno en la línea de células huéspedes, y contiene secuencias que codifican para el péptido señal, pero no para  $\alpha$ -Gal A humana. El constructo de selección como diana también contiene casetes de expresión para los genes *neo* bacteriano y *dhfr* de ratón. Éstos permiten la selección de fragmentos de selección como diana integrados de manera estable (mediante el gen *neo*) y para la selección posterior del gen *dhfr* usando una selección con metotrexato (MTX) gradual.

Además, pGA213C contiene secuencias diseñadas para seleccionar como diana secuencias cromosómicas en sentido 5' del locus de  $\alpha$ -Gal A endógeno mediante recombinación homóloga. La recombinación homóloga entre el locus de  $\alpha$ -Gal A endógeno y el fragmento de ADN de 9,6 kb de pGA213C se muestra en la figura 10.

Se construyó pGA213C para delecionar 962 pb de secuencias genómicas que se extienden desde las posiciones -1183 a -222 con respecto al codón de iniciación de metionina de  $\alpha$ -Gal A, tras la recombinación homóloga del fragmento de pGA213C con el locus de  $\alpha$ -Gal A del cromosoma X. La activación transcripcional del locus de  $\alpha$ -Gal A se produce mediante una selección como diana precisa de las secuencias reguladoras exógenas en sentido 5' de la región que codifica para la  $\alpha$ -Gal A. El locus de GA-GAL resultante hace que la transcripción se inicie desde el promotor de CMV y avance por el exón 1 del CMV, el intrón de la aldolasa y los siete exones y seis intrones de la secuencia que codifica para la  $\alpha$ -Gal A. El corte y empalme del ARNm de precursor grande une el exón de CMV exógeno (insertado mediante selección como diana) con el primer exón endógeno entero del transcrito de  $\alpha$ -Gal A. La traducción del ARNm de GA-GAL da como resultado GA-GAL previa con un péptido señal de treinta y un aminoácidos. Tras la secreción a partir de la célula huésped, se elimina el péptido señal. En primer lugar se identifican líneas celulares seleccionadas correctamente como diana mediante reacción en cadena de la polimerasa explorando para detectar la presencia del ARNm de GA-GAL. También se encuentra que los clones que producen ARNm de GA-GAL secretan  $\alpha$ -Gal A enzimáticamente activa en el medio de cultivo. La confirmación posterior de acontecimientos de selección como diana se logra mediante digestión con enzimas de restricción y análisis de hibridación por transferencia de tipo Southern de ADN genómico.

Se expusieron las células a selección con metotrexato ("MTX") gradual. Tras la selección en MTX 0,05  $\mu$ M, se aisló un clon de células y se sometió a selección con MTX 0,1  $\mu$ M. A partir de este procedimiento se aisló una combinación de células resistentes a MTX 0,1  $\mu$ M (línea celular RAG001), se expandió en cultivo y se caracterizó.

## Ejemplo 2 Purificación de $\alpha$ -Gal A

Lo siguiente es un procedimiento preferido para producir, purificar y someter a prueba  $\alpha$ -Gal A. El procedimiento de purificación mantiene  $\alpha$ -Gal A en una forma soluble, activa, nativa a lo largo de todo el procedimiento de purificación. La proteína no se expone a extremos de pH, disolventes orgánicos ni detergentes, y no se escinde proteolíticamente durante el procedimiento de purificación, y no forma agregados. El procedimiento de purificación está diseñado para no alterar la distribución de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A.

### 2.1 Purificación de $\alpha$ -Gal A

El ejemplo 2.1 ilustra que  $\alpha$ -Gal A puede purificarse hasta casi la homogeneidad a partir de un medio condicionado de cepas de células humanas en cultivo que se han transfectado de manera estable para producir la enzima.  $\alpha$ -Gal A se aísla de medios que contienen  $\alpha$ -Gal A usando una serie de cinco etapas cromatográficas. Las cinco etapas utilizan diversos principios de separación que aprovechan diferentes propiedades físicas de la enzima para separar  $\alpha$ -Gal A del material contaminante. Se incluye la cromatografía de interacción hidrófoba sobre butil-Sepharose®, interacción iónica sobre hidroxipatito, cromatografía de intercambio aniónico sobre Q Sepharose®, y cromatografía de exclusión molecular sobre Superdex® 200. Además de ser la etapa final del procedimiento de purificación, la cromatografía de exclusión molecular también sirve como medio eficaz para intercambiar la proteína purificada en un tampón compatible con la formulación.

#### A. Uso de cromatografía con butil-Sepharose® como primera etapa en la purificación de $\alpha$ -Gal A

Se aclaró medio condicionado frío (1,34 litros) mediante centrifugación y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45  $\mu$ m usando prefiltros de fibra de vidrio. Mientras se agitaba, se ajustó el pH del medio frío, filtrado hasta 5,6 mediante la adición gota a gota de HCl 1 N, y se añadió sulfato de amonio hasta una concentración final de 0,66 M mediante la adición gota a gota de una disolución madre (temperatura ambiente) de sulfato de amonio ultrapuro 3,9 M. Se agitó el medio durante otros 5 minutos a 4°C, se filtró como anteriormente y se aplicó a una columna de butil-Sepharose® 4 Fast Flow (volumen de columna de 81 ml, 2,5 x 16,5 cm; Pharmacia, Uppsala, Suecia) que se había equilibrado en MES-Tris 10 mM, pH 5,6, que contenía sulfato de amonio 0,66 M (tampón A). Se realizó la cromatografía a 4°C sobre un sistema Gradi-Frac™ (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equipado con monitores en línea de UV (280 nm) y conductividad para evaluar la concentración de proteína total y

sal, respectivamente. Tras la aplicación de la muestra a una velocidad de flujo de 10 ml/min, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón A. Se eluyó la  $\alpha$ -Gal A de la columna de butil-Sepharose® con un gradiente lineal de 14 volúmenes de columna desde tampón A (que contiene sulfato de amonio) hasta MES-Tris 10 mM, pH 5,6 (sin sulfato de amonio). Se sometieron a ensayo fracciones para detectar actividad de  $\alpha$ -Gal A mediante el ensayo de 4-MUF-gal, y se combinaron las que contenían una actividad de enzima apreciable. Tal como se observa en la figura 8 y el resumen de purificación (tabla 5), esta etapa elimina aproximadamente el 99% de la proteína contaminante (muestra de antes de la columna = 8,14 g de proteína total; muestra de después de la columna = 0,0638 g de proteína total).

**Tabla 5: Purificación de  $\alpha$ -Gal A a partir de medio condicionado de fibroblastos humanos transfectados de manera estable**

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Actividad de $\alpha$ -Gal A ( $\times 10^6$ unidades)	Proteína total (mg)	Actividad específica ( $\times 10^6$ unidades/mg)	Purificación en veces (acumulativa)	Recuperación en porcentaje
Sobrenadante de cultivo	1340	14,6	8140	0,0018	=1	=100
Butil-Sepharose®	417	14,1	63,8	0,221	123	96,6
Heparina-Sepharose®	134	12,1	14,6	0,829	436	82,9
Hidroxiapatito	47	9,73	4,46	2,18	1220	66,6
Q Sepharose®	31,5	8,91	3,31	2,69	1503	61,0
Superdex® 200	10	8,58	2,93	2,92	1634	59,0

#### B. Uso de cromatografía con Heparina-Sepharose® como etapa para la purificación de $\alpha$ -Gal A

Se dializaron las fracciones pico de la columna de butil-Sepharose® a 4°C frente a (4 litros) de MES-Tris 10 mM, pH 5,6 (cambiado una vez). Se ajustó la conductividad del dializado hasta HO 1,0 mM a 4°C mediante adición de H<sub>2</sub>O o NaCl según fuera necesario. Posteriormente, se aplicó la muestra a una columna de Heparina-Sepharose® 6 Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Suecia; volumen de columna de 29 ml, 2,5 x 6 cm) que se había equilibrado en MES-Tris 10 mM, pH 5,6, que contenía NaCl 9 mM (tampón B). Esto se realizó a 4°C a una velocidad de flujo de 10 ml/min. Monitores en línea de UV (280 nm) y conductividad midieron la concentración de proteína total y sal.

Tras aplicar la muestra, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón B seguido por un gradiente lineal de 3 volúmenes de columna hasta un 8% de tampón C/92% de tampón B (en el que tampón C es MES-Tris 10 mM, pH 5,6, que contiene NaCl 250 mM) y un lavado de 10 volúmenes de columna con un 8% de tampón C. Esto se siguió por elución de  $\alpha$ -gal A con un gradiente lineal de 1,5 volúmenes de columna hasta un 29% de tampón C y un gradiente lineal posterior de 10 volúmenes de columna hasta un 35% de tampón C. Se sometieron a ensayo las fracciones para detectar actividad de  $\alpha$ -gal A, y se combinaron las que contenían actividad apreciable.

#### C. Uso de cromatografía con hidroxiapatito como etapa para la purificación de $\alpha$ -Gal A

Se filtró la combinación de heparina y se aplicó directamente a una columna de hidroxiapatito de cerámica HC (40  $\mu$ m; American International Chemical, Natick, MA; volumen de columna de 12 ml, 1,5 x 6,8 cm) que se había equilibrado en fosfato de sodio 1 mM, pH 6,0 (tampón D). Se realizó la cromatografía a temperatura ambiente sobre un sistema híbrido Gradi-Frac™/FPLC® (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equipado con monitores en línea de UV (280 nm) y conductividad. Tras aplicar la muestra (5 ml/min), se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón D. Se eluyó la  $\alpha$ -Gal A con un gradiente lineal de 7 volúmenes de columna hasta un 42% de tampón E/58% de tampón D (en el que el tampón E es fosfato de sodio 250 mM, pH 6,0) seguido por un gradiente de 10 volúmenes de columna hasta un 52% de tampón E. Se sometieron a ensayo las fracciones para detectar actividad de  $\alpha$ -Gal A, y se combinaron las fracciones que contenían actividad apreciable.

#### D. Uso de cromatografía de intercambio aniónico Q Sepharose® como etapa para la purificación de $\alpha$ -Gal A

Se diluyó la combinación de hidroxiapatito aproximadamente 1,5 veces con H<sub>2</sub>O hasta una conductividad final de HO 3,4-3,6 mM a temperatura ambiente. Tras filtrar, se aplicó la muestra a una columna de Q Sepharose® HP (Pharmacia, Uppsala, Suecia; volumen de columna de 5,1 ml, 1,5 x 2,9 cm) equilibrada en un 10% de tampón G/90% de tampón F, en el que el tampón F es fosfato de sodio 25 M, pH 6,0, y el tampón G es fosfato de sodio 25 mM, pH 6,0, NaCl 250 mM. Se realizó la cromatografía a temperatura ambiente en el sistema híbrido Gradi-Frac™/FPLC® (Pharmacia, Uppsala, Suecia), y se monitorizaron las concentraciones de proteína total y sal mediante los monitores en línea. Se aplicó la muestra a una velocidad de flujo de 5 ml/min, después se realizaron las siguientes etapas: (1) un lavado de 5 volúmenes de columna al 10% de tampón G, (2) un lavado de 7 volúmenes de

columna al 12% de tampón G, (3) un gradiente lineal de 3 volúmenes de columna hasta el 50% de tampón G, (4) un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna hasta el 53% de tampón G, (5) un gradiente de 3 volúmenes de columna hasta el 100% de tampón G y (6) un lavado de 10 volúmenes de columna al 100% de tampón G. La  $\alpha$ -Gal A se eluyó principalmente durante las etapas 3 y 4. Se combinaron las fracciones que contenían actividad apreciable (la "combinación Q").

#### E. Uso de cromatografía de filtración en gel de Superdex®-200 como etapa para la purificación de $\alpha$ -Gal A

Se concentró la combinación Q aproximadamente 5 veces usando unidades de concentración centrífuga Centriprep®-10 (Amicon, Beverly, MA), y se aplicó a una columna de Superdex® 200 (Pharmacia, Uppsala, Suecia; volumen de columna de 189 ml, 1,6 x 94 cm). Se equilibró la columna y se eluyó con fosfato de sodio 25 mM, pH 6,0, que contenía NaCl 150 mM. Se realizó la cromatografía en un sistema FPLC® (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente usando un monitor en línea de UV (280 nm) para seguir la elución de la proteína. El volumen de la muestra aplicado a la columna fue de  $\leq 2$  ml, la velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min y el tamaño de fracción fue de 2 ml. Se realizaron múltiples series de columnas; se sometieron a ensayo las fracciones para determinar la actividad de  $\alpha$ -Gal A y se combinaron las fracciones que contenían actividad apreciable.

Se concentraron las fracciones combinadas de la columna Superdex® 200 usando unidades Centriprep 10, se prepararon alícuotas, se congelaron instantáneamente y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante cortos periodos de tiempo. En la tabla 5 se muestra un resumen de este ejemplo de purificación de  $\alpha$ -Gal A. El rendimiento final de  $\alpha$ -Gal A fue del 59% de la actividad del material de partida, y la actividad específica del producto purificado fue de  $2,92 \times 10^6$  unidades/mg de proteína. El producto resultante mostró un alto nivel de pureza tras la electroforesis en condiciones reductoras en un gel de SDS-poliacrilamida al 4-15%, que posteriormente se tiñó con plata.

## Sumario

El procedimiento de purificación proporciona  $\alpha$ -Gal A sumamente purificada. La mayor parte de la purificación se produce en las 2 primeras etapas del procedimiento, mientras que las tres etapas finales sirven para pulir el material eliminando los contaminantes minoritarios restantes. La última etapa, la cromatografía de exclusión molecular en Superdex® 200, también sirve para intercambiar la  $\alpha$ -Gal A en un tampón compatible con la formulación.

### 2.2 Tamaño de $\alpha$ -Gal A producida por células humanas transfectadas de manera estable en cultivo

Se investigaron las propiedades estructurales y funcionales de la  $\alpha$ -Gal A humana purificada. El producto resultante mostró un alto nivel de pureza tras la electroforesis en condiciones reductoras en un gel del 4-15% de SDS-poliacrilamida, que posteriormente se tiñó con plata.

Se estimó la masa molecular de  $\alpha$ -Gal A mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF. Estos resultados demuestran que la masa molecular del dímero es de 102.353 Da, mientras que la del monómero es de 51.002 Da. La masa molecular esperada del monómero, basándose en la composición de aminoácidos, es de 45.400 Da. Por tanto, el contenido en hidratos de carbono de la enzima representa hasta 5.600 Da del peso molecular.

### 2.3 Modificación de hidratos de carbono de $\alpha$ -Gal A producida por células humanas transfectadas de forma estable

También se evaluó el patrón de glicosilación de  $\alpha$ -Gal A producida según la invención. La glicosilación apropiada es importante para una actividad *in vivo* óptima de la  $\alpha$ -Gal A; la  $\alpha$ -Gal A expresada en sistemas no glicosilantes es inactiva o inestable. Hantzopolous *et al.*, Gene 57: 159 (1987). La glicosilación también es importante para la internalización de la  $\alpha$ -Gal A en las células diana deseadas, y afecta a la semivida en circulación de la enzima *in vivo*. En cada subunidad de  $\alpha$ -Gal A, hay cuatro sitios disponibles para la adición de cadenas de hidratos de carbono unidas a asparagina, de los cuales sólo tres están ocupados. Desnick *et al.*, en THE METABOLIC AND MOLECULAR BASES OF INHERITED DISEASE, (McGraw Hill, Nueva York, 1995) págs. 2741-2780.

Se trató con neuraminidasa una muestra de  $\alpha$ -Gal A producida por células transfectadas de forma estable, que se aísla de *A. urafaciens*, (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN) para eliminar el ácido siálico. Se realizó esta reacción tratando 5 mg de  $\alpha$ -Gal A durante la noche con 10 mU de neuraminidasa a temperatura ambiente en un volumen total de 10 ml de solución salina tamponada con acetato (ABS, acetato de sodio 20 mM, pH 5,2, NaCl 150 mM).

También se desfosforiló  $\alpha$ -Gal A purificada producida por células transfectadas de manera estable usando fosfatasa alcalina (fosfatasa alcalina de intestino de ternero, Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN), tratando 5 mg de  $\alpha$ -Gal A durante la noche a temperatura ambiente con 15 U de fosfatasa alcalina en ABS (pH aumentado hasta 7,5 con Tris 1 M).

Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y/o isoelectroenfoque seguido por inmunotransferencia de tipo Western con un anticuerpo específico anti- $\alpha$ -Gal A. El anticuerpo usado era un anticuerpo policlonal de conejo anti-péptido, que se produjo usando un péptido que representa los aminoácidos 68-81 de  $\alpha$ -Gal A como un inmunógeno. Tras la transferencia de la proteína a PVDF (Millipore, Bedford, MA), se detectó con sondas la membrana con una dilución 1:2000 del antisuero en un 2,5% de Blotto (leche en polvo desnatada en TrisHCl 20 mM, pH 7,5, Tween-20 al 0,05%). Esto se siguió por la detección con IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasas del rábano (Organo Technique/Cappella, Durham, NC; dilución 1:5000) y reactivos del kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham, Arlington Heights, IN).

El tratamiento de  $\alpha$ -Gal A con neuraminidasa seguido por análisis de SDS-PAGE dio como resultado un desplazamiento en la masa molecular (de aproximadamente 1500-2000 Da o 4-6 ácidos siálicos/monómero), lo que sugiere que hay una modificación amplia de la  $\alpha$ -Gal A con ácido siálico. Para referencia, la forma en plasma de  $\alpha$ -Gal A tiene 5-6 residuos de ácido siálico por monómero, y la forma en placenta tiene 0,5-1,0 residuos de ácido siálico por monómero. Bishop *et al.*, J. Biol. Chem. 256: 1307 (1981).

Otro procedimiento usado para examinar las modificaciones con ácido siálico y M6P de  $\alpha$ -Gal A fue el isoelectroenfoque (IEF), en el que se separan las muestras basándose en su punto isoelectrónico (pI) o carga neta. Por tanto, se espera que la eliminación de residuos cargados tales como ácido siálico o fosfato de la  $\alpha$ -Gal A altere la movilidad de la proteína en el sistema de IEF.

Para realizar el experimento de IEF, se trataron con neuraminidasa y/o fosfatasa alcalina muestras de  $\alpha$ -Gal A producidas según la invención, se mezclaron 1:1 con 2 X tampón de muestra Novex (con urea 8 M, pH 3,0-7,0) y se cargaron sobre un gel de IEF de urea 6 M (5,5% de poliacrilamida) preparado usando Pharmalyte® (Pharmacia, Uppsala, Suecia; pH 3,0-6,5; Pharmalyte® 4-6,5 y 2,5-5,5, 0,25 ml de cada uno por gel). También se incluyeron patrones de punto isoelectrónico (Bio-Rad). Tras la electroforesis, se transfirió el gel a PVDF y se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió anteriormente.

El tratamiento con neuraminidasa de la enzima aumentó el pI de las tres isoformas, lo que indica que todas se modificaron en cierto grado mediante ácido siálico. Estos datos sugieren que las preparaciones de  $\alpha$ -Gal A producidas tal como se describe en el presente documento deben tener una semivida en plasma deseable, lo que indica que este material es bastante adecuado para su uso farmacológico. Además, el tratamiento con fosfatasa alcalina de  $\alpha$ -Gal A tratada con neuraminidasa aumentó adicionalmente el pI de una parte de la proteína hasta aproximadamente 5,0-5,1, lo que indica que la enzima lleva uno o más residuos de M6P. Esta modificación se requiere para una internalización eficaz de  $\alpha$ -Gal A por las células diana.

Se analizaron las cadenas de hidratos de carbono de  $\alpha$ -Gal A unidas en N mediante HPLC de intercambio iónico (Glyco-Sep C) y marcaje del extremo no reductor con el compuesto fluorescente 2-aminobenzamida (AB). Los resultados del análisis de AB-glucanos a partir de tres preparaciones de  $\alpha$ -Gal A separadas se resumen en la tabla 6. Las tres preparaciones tenían un número Z superior a 170. Además, más del 67% de los glucanos estaban sialilados, más del 16% de los glucanos estaban fosforilados y menos del 16% eran neutros. Estos resultados resultaron muy favorables en comparación con los resultados notificados en la técnica anterior. Por ejemplo, Desnick *et al.*, (patente estadounidense 5.356.804) notificaron que más del 60% de los glucanos eran neutros, estando sialilados sólo el 11 %.

**Tabla 6**  
**Resultados del análisis de AB-glucanos a partir de GA-GAL**

Tratamiento	Número Z	% de neutros	% de mono	% de di	% de tri	% de tetra
Ninguno	170,04	16,83	22,8	39,45	15,34	5,58
Ninguno	177,71	14,22	20,63	44,62	14,2	6,31
Ninguno	171,68	15,81	20,73	43,2	14,33	5,39
Media (N=3)	173,14	15,62	21,39	42,42	14,62	5,76
Neuraminidasa	24,36	85,25	5,14	9,61	ND	ND
Fosfatasa alcalina	150,93	23,38	24,47	34,28	13,58	4,29
<b>Porcentaje del total:</b>	<b>Preparaciones de GA-GAL de la presente invención</b>	<b>Desnick <i>et al.</i>, patente estadounidense 5.356.804</b>				
<b>P-glucanos totales</b>	16,62			24,1		
<b>Sialilados totales</b>	67,57			11		
<b>Neutros totales (hih-manosa e híbridos)</b>	15,62			62,9		

En la tabla 7 se proporcionan caracterizaciones más detalladas de las preparaciones de GA-GAL purificada.

5

**Tabla 7 Preparación a granel purificada de GA-GAL**

10

Ensayo	40-173-KH	42-202-KH
Actividad específica	2,75	2,80
SDS-PAGE y Coomassie	100%	100%
SDS-PAGE y tinción con plata	99,6%	100%
HPLC de fase inversa	100%	99,94
Cromatografía de exclusión molecular	0%	0,01%
Internalización por fibroblastos del prepucio	123,6%	94,3%

## 15 2.4 Parte creciente de $\alpha$ -Gal A cargada mediante fraccionamiento de especies de $\alpha$ -Gal A

Tal como se trató anteriormente, el fraccionamiento de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A puede producirse en diversas etapas en el procedimiento de purificación tal como se describe en el presente documento. En el presente ejemplo, se fraccionaron glicofomas de  $\alpha$ -Gal A por tamaño y por carga. También es posible fraccionar  $\alpha$ -Gal A mediante una combinación de estas u otras técnicas cromatográficas tal como se describió anteriormente.

Para el fraccionamiento por tamaño de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A, se realizó cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex® 200 (Pharmacia, 1,6 cm por 94,1 cm) equilibrada en solución salina tamponada con fosfato a pH 6. Se cargó  $\alpha$ -Gal A (2,6 mg en 1 ml) sobre la columna y se eluyó la columna a 0,35 ml/min. Se recogieron fracciones a lo largo del perfil de elución y se analizaron mediante SDS-PAGE las fracciones que comprendían el pico de elución ancho de  $\alpha$ -Gal A, después se visualizaron mediante tinción con plata. Las fracciones en el primer borde del pico contenían  $\alpha$ -Gal A del mayor peso molecular y, a medida que las fracciones continuaron a lo largo del pico, el peso molecular aparente de la  $\alpha$ -Gal A disminuyó gradualmente. Entonces se seleccionaron las fracciones de  $\alpha$ -Gal A y se combinaron para proporcionar una preparación de  $\alpha$ -Gal A de los intervalos de peso molecular deseados.

Para el fraccionamiento de glicofomas de  $\alpha$ -Gal A por carga, se fraccionó la  $\alpha$ -Gal A mediante cromatografía con Q-Sepharose®. Se equilibró la columna Q-Sepharose® (1,5 cm por 9,4 cm) en fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0, que contenía NaCl 30 mM y se mantuvo la velocidad de flujo a 5 ml/min. Se cargó  $\alpha$ -Gal A (130 mg en 166 ml) sobre la columna, se lavó con tampón de equilibrado y después se eluyó con fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0, que contenía NaCl 130 mM. Para un fraccionamiento más amplio, puede usarse una elución en gradiente (por ejemplo, 10 volúmenes de columna) desde el tampón de equilibrado hasta el tampón de elución. Se recogieron fracciones a lo largo del perfil de elución y se analizaron mediante SDS-PAGE las fracciones que comprendían el pico de elución de  $\alpha$ -Gal A, después se visualizaron mediante tinción con plata. La especie de menor peso molecular observada sobre el gel eluyó en el lavado y en el primer borde del pico, las glicofomas del mayor peso molecular eluyeron hacia el final del pico. La especie de menor peso molecular corresponde a las glicofomas menos negativamente cargadas de  $\alpha$ -Gal A, que se unen menos fuertemente a la columna de Q-Sepharose® cargada positivamente (compuesta por una resina sustituida con amina cuaternaria). La especie de  $\alpha$ -Gal A de la mayor carga negativa eluyó después en el perfil de elución y tiene un peso molecular superior, según se analizó mediante SDS-PAGE. El fraccionamiento por carga se confirmó mediante isoelectroenfoque de las fracciones eluidas o de combinaciones seleccionadas.

Por tanto, tanto el fraccionamiento por tamaño como el fraccionamiento por carga permitieron la selección de glicofomas sumamente cargadas de  $\alpha$ -Gal A.

## 50 2.5 Internalización de $\alpha$ -Gal A mediada por manosa o manosa-6-fosfato (M6P)

Para que la  $\alpha$ -Gal A producida por células transfectadas de manera estable sea un agente terapéutico eficaz para deficiencias de  $\alpha$ -Gal A, debe internalizarse la enzima por las células afectadas.  $\alpha$ -Gal A es mínimamente activa a niveles fisiológicos de pH, por ejemplo, en la sangre o fluidos intersticiales.  $\alpha$ -Gal A sólo metaboliza de manera óptima los sustratos lipídicos acumulados cuando se internaliza en el entorno ácido del lisosoma. Esta internalización está mediada por la unión de  $\alpha$ -Gal A a receptores de M6P, que se expresan sobre la superficie celular y administran la enzima al lisosoma mediante la ruta endocítica. El receptor de M6P se expresa de manera ubicua; la mayor parte de las células somáticas expresan M6P en algún grado. El receptor de manosa, que es específico para residuos de manosa expuestos sobre glicoproteínas, es menos prevalente. Generalmente, los receptores de manosa sólo se encuentran sobre macrófagos y células similares a macrófagos, y proporcionan un medio adicional de entrada de  $\alpha$ -Gal A en estos tipos celulares.

Con el fin de demostrar la internalización de  $\alpha$ -Gal A mediada por M6P, se cultivaron durante la noche en presencia de concentraciones crecientes de  $\alpha$ -Gal A purificada de la invención fibroblastos de la piel de un paciente

con enfermedad de Fabry (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository). Algunas de las muestras contenían M6P soluble 5 mM, que inhibe de manera competitiva la unión a, e internalización por, el receptor de M6P. Otras muestras contenían 30 mg/ml de manano, que inhibe la unión a, e internalización por, el receptor de manosa. Tras la incubación, se lavaron las células y se recogieron mediante rascando en tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7,2, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, Pefabloc™ 2 mM (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN) y NP-40 al 1%). Entonces se sometieron a ensayo las muestras lisadas para determinar la concentración de proteína y la actividad de la  $\alpha$ -Gal A. Los resultados se expresan como unidades de actividad  $\alpha$ -Gal A/mg de proteína celular. Las células de Fabry internalizaron  $\alpha$ -Gal A de una manera dependiente de la dosis. Esta internalización se inhibió por M6P, pero no hubo inhibición con manano. Por tanto, la internalización de  $\alpha$ -Gal A en fibroblastos de Fabry está mediada por el receptor de M6P, pero no por el receptor de manosa.

También se internalizó  $\alpha$ -Gal A *in vitro* por células endoteliales, células diana importantes para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. Se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC) durante la noche con 7500 unidades de  $\alpha$ -Gal A; algunos de los pocillos contenían M6P. Tras el periodo de incubación, se recogieron las células y se sometieron a ensayo para detectar  $\alpha$ -Gal A tal como se describió anteriormente. Las células incubadas con  $\alpha$ -Gal A tenían niveles de enzima de casi 10 veces los de las células control (sin incubación con  $\alpha$ -Gal A). M6P inhibió la acumulación intracelular de  $\alpha$ -Gal A, lo que sugiere que la internalización de  $\alpha$ -Gal A por HUVEC está mediada por el receptor de M6P. Por tanto, la  $\alpha$ -Gal A humana de la invención se internaliza por células clínicamente relevantes.

Se conocen pocas líneas celulares humanas cultivadas que expresen el receptor de manosa. Sin embargo, puede usarse una línea celular similar a macrófagos de ratón (J774.E) que lleva receptores de manosa pero pocos, si lleva alguno, receptores de M6P para determinar si la  $\alpha$ -Gal A purificada de la invención se internaliza mediante el receptor de manosa. Diment *et al.*, J. Leukocyte Biol. 42: 485-490 (1987). Se cultivaron células J774.E durante la noche en presencia de 10.000 unidades/ml de  $\alpha$ -Gal A. Las muestras seleccionadas también contenían M6P 2 mM, y otras contenían 100 mg/ml de manano. Se lavaron las células y se recogieron tal como se describió anteriormente, y se determinaron la proteína total y la actividad de la  $\alpha$ -Gal A de cada muestra. M6P no inhibe la captación de  $\alpha$ -Gal A por estas células, mientras que el manano reduce los niveles de  $\alpha$ -Gal A acumulada en un 75%. Por tanto, la  $\alpha$ -Gal A de la invención puede internalizarse por el receptor de manosa en tipos celulares que expresan este receptor de superficie celular particular.

### Ejemplo 3 Formulación farmacéutica

#### Preparación de formulaciones y disoluciones tampón

Se diluye una preparación a granel purificada de  $\alpha$ -Gal A hasta una concentración final con diluyente de  $\alpha$ -Gal A. Basándose en el volumen de preparación a granel purificada que va a formularse, la concentración de  $\alpha$ -Gal A (mg/ml) y la concentración deseada de  $\alpha$ -Gal A en la formulación final, se determina el volumen de diluyente de  $\alpha$ -Gal A requerido. El diluyente de  $\alpha$ -Gal A se prepara en el plazo de 24 horas de uso mezclando cantidades apropiadas de WFI, cloruro de sodio y fosfato de sodio monobásico, y ajustando el pH hasta 6,0 con disolución de hidróxido de sodio. La composición de diluyente de  $\alpha$ -Gal A se menciona en la tabla 8.

**Tabla 8**  
**COMPOSICIÓN DE DILUYENTE DE  $\alpha$ -GAL A (por litro)**

Componente	Número de partes	Cantidad
Cloruro de sodio (USP)	100-1916	8,8 g
Hidróxido de sodio, 5 N	200-1903	cantidad suficiente para ajustar el pH hasta 6,0
Fosfato de sodio, monobásico (USP)	100-1913	3,5 g
Agua para inyección (USP)	100-2301	cantidad suficiente hasta 1,0 l

Se filtran volúmenes de un litro o menores de diluyente de  $\alpha$ -Gal A mediante titración a vacío usando filtros de nylon de 0,2 mm estéril (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Se filtran volúmenes mayores mediante presión positiva usando una bomba peristáltica y filtros de cápsula Supor® de 0,2 mm (Pall, Port Washington, NY). Se someten todos los filtros a pruebas de integridad de punto de burbujeo tras la filtración. Se realizan etapas de mezclado y filtración en una campana de flujo laminar de clase 100 certificada. Se añade diluyente de  $\alpha$ -Gal A a la preparación a granel purificada de  $\alpha$ -Gal A en un vaso de mezclado para dar una disolución final de 1 mg/ml. Después se añade el volumen apropiado de polisorbato 20 (Tween 20, Spectrum) para alcanzar una concentración final del 0,02%.

#### Ejemplo Comparativo 4 $\alpha$ -Gal A desgalactosilada desialilada

Para explorar el efecto de la glicosilación sobre la biodistribución de  $\alpha$ -Gal A, se desglucosiló secuencialmente una preparación purificada de  $\alpha$ -Gal A y se inyectó cada forma a ratones. Se recogieron los

órganos de los ratones a las cuatro horas tras las inyecciones y se realizó la inmunohistoquímica sobre los tejidos para visualizar posibles cambios en la biodistribución de la proteína.

5 En primer lugar se trató la  $\alpha$ -Gal A con neuraminidasa (sialidasa) para eliminar residuos de ácido siálico, dejando los restos de galactosa expuestos. Una parte de esta forma tratada con sialidasa se hizo reaccionar adicionalmente con  $\beta$ -galactosidasa para eliminar residuos de galactosa; esto dejó los residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAC) expuestos. Después se eliminaron los GlcNAC mediante N-acetilglucosaminidasa, dejando los grupos de manosa del núcleo en la proteína. Se inyectaron  $\alpha$ -Gal A sin tratar (control) o una de las formas tratadas de la proteína en ratones a través de la vena de la cola. Cuatro horas tras las inyecciones, se recogieron el hígado, bazo, corazón, riñón y pulmones de los ratones, se conservaron y se inmunotifieron para la detección de  $\alpha$ -Gal A.

15 Cuando se comparó con animales control que recibieron proteína sin tratar, los ratones que recibieron la enzima tratada con sialidasa (residuos de galactosa expuestos) tenían más  $\alpha$ -Gal A localizada en el hígado y de manera correspondiente menos enzima en otros órganos examinados. Adicionalmente, el patrón de tinción en el hígado fue bastante diferente. En animales control, la  $\alpha$ -Gal A se localizó principalmente en células de Kupffer y células endoteliales sólo con tinción de hepatocitos moderada. En animales que recibieron la  $\alpha$ -Gal A tratada con sialidasa, la enzima se localizó sólo en los hepatocitos, de manera coherente con la biodistribución conocida del receptor de asialoglicoproteína. Este efecto de la desglucosilación sobre la biodistribución se invirtió cuando se eliminaron los residuos de galactosa mediante  $\beta$ -galactosidasa. El patrón de tinción observado en el hígado de los ratones que recibieron esta proteína sin restos de galactosa fue similar al de los animales control; la mayor parte de la tinción estaba en las células de Kupffer y células endoteliales, con tinción de hepatocitos mínima. El tratamiento adicional de la  $\alpha$ -Gal A con N-acetilglucosaminidasa no alteró el patrón de tinción del observado para la proteína tratada con  $\beta$ -galactosidasa; es decir, la eliminación de residuos de N-acetilglucosamina pareció tener poco efecto sobre la biodistribución de  $\alpha$ -Gal A.

#### Ejemplo 5 Corrección de fibroblastos de Fabry por fibroblastos humanos que expresan $\alpha$ -Gal A

30 Para la terapia génica, un implante de células autólogas que producen  $\alpha$ -Gal A debe producir la enzima en una forma modificada de manera apropiada para "corregir" la deficiencia de  $\alpha$ -Gal A en células diana. Para evaluar el efecto de la producción de  $\alpha$ -Gal A por fibroblastos humanos transfectados sobre células de Fabry, se cultivaron conjuntamente fibroblastos recogidos de pacientes con enfermedad de Fabry (NIGMS Human Genetics Mutant Cell Repository) con una cepa celular de producción de  $\alpha$ -Gal A (BRS-11) en Transwells® (Costar, Cambridge, MA). Se cultivaron células de Fabry en placas de cultivo tisular de 12 pocillos, algunas de las cuales contenían insertos (Transwells®, 0,4 mm de tamaño de poro) que tenían una superficie sobre la que pueden crecer las células. La matriz de crecimiento del inserto es porosa y permite que las macromoléculas pasen desde el medio superior hasta el inferior. Un conjunto de insertos contenían fibroblastos de prepucio humano (HF) normales, que secretan niveles mínimos de  $\alpha$ -Gal A, mientras que otro conjunto contenía la cepa de fibroblastos humanos transfectados de manera estable, BRS-11, que secreta grandes cantidades de  $\alpha$ -Gal A. En los pocillos cultivados conjuntamente con células de producción de  $\alpha$ -Gal A, la  $\alpha$ -Gal A puede entrar en el medio que baña las células de Fabry y potencialmente puede internalizarse por las células de Fabry.

45 Los datos en la tabla 9 muestran que las células de Fabry internalizaron la  $\alpha$ -Gal A secretada. Se monitorizaron los niveles intercelulares de  $\alpha$ -Gal A durante 3 días. Las células cultivadas solas (sin inserto) o en presencia de fibroblastos de prepucio no transfectados (inserto de HF) tuvieron niveles intracelulares muy bajos de actividad  $\alpha$ -Gal A. Sin embargo, las células de Fabry cultivadas con las células de producción de  $\alpha$ -Gal A (inserto de BRS-11), mostraron niveles de enzimas similares a los de las células normales al final del día 2 (los fibroblastos normales tienen 25-80 unidades de  $\alpha$ -Gal A/mg de proteína). El que la corrección pueda atribuirse a la captación de  $\alpha$ -Gal A mediante el receptor de M6P se demuestra mediante la inhibición con M6P (inserto de BRS-11 + M6P).

50 **Tabla 9**  
**CORRECCIÓN DE FIBROBLASTOS DE FABRY POR FIBROBLASTOS HUMANOS QUE**  
**EXPRESAN ACTIVIDAD  $\alpha$ -Gal A (unidades/mg de proteína total)**

55 <b>Tiempo</b>	<b>Nº de inserto</b>	<b>Inserto de HF</b>	<b>Inserto de BRS-11</b>	<b>Inserto de BRS-11 + M6P</b>
Día 1	2 ± 1	2 ± 1	13 ± 1	4 ± 1
Día 2	2 ± 1	2 ± 1	40 ± 11	6 ± 2
Día 3	2 ± 1	5 ± 1	85 ± 1	9 ± 1

60 La descripción anterior se ha presentado solamente con propósitos de ilustración y no se pretende que limite la invención a la forma precisa divulgada.

65 En esta especificación, las formas singulares incluyen referencias plurales, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> shire Human Genetic Therapies, Inc.

5 <120> PREPARACIONES MÉDICAS PARA EL TRATAMIENTO DE DEFICIENCIA DE ALFA-GALACTOSIDASA  
A

<130> PC785886EPB

10 <140>  
<141> 2000-03-09

<150> USSN 09/266,014  
<151> 1999-03-11

15 <160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

20 <210> 1  
<211> 210  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Sonda de biblioteca de fibroblastos humanos: exón 7, incluyendo cebadores de amplificación.

<400> 1

30 ctgggctgta gctatgataa accggcagga gattgggtgga cctcgctctt ataccatcgc 60  
agttgcttcc ctgggtaaaag gagtggcctg taatcctgcc tgcttcatca cacagctcct 120  
ccctgtgaaa aggaagctag ggttctatga atggacttca aggtaagaa gtcacataaa 180  
tcccacaggc actgttttgc ttcagctaga 210

35 <210> 2  
<211> 268  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: extremo 5' de clon de ADNc incluyendo cebadores de amplificación.

45 <400> 2

attggtccgc ccctgaggtt aatcttaaaa gccaggtta cccgcggaag tttatgctgt 60  
ccggtcaccg tgacaatgca gctgaggaac ccagaactac atctgggctg cgcgcttgcg 120  
cttcgcttcc tggccctcgt ttcttgggac atccctggg ctagagcact ggacaatgga 180  
50 ttggcaagga cgcctaccat gggctggctg cactgggagc gcttcatgtg caaccttgac 240  
tgccaggaag agccagattc ctgcatca 268

<210> 3  
<211> 1343  
55 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 3

60

65

ES 2 634 317 T3

```

5      ccgcgggaaa tttatgctgt cgggtcaccg tgacaatgca gctgaggaac ccagaactac 60
      atctgggctg cgcgcttgcg cttcgcttcc tggccctcgt ttcctgggac atccctgggg 120
      ctagagcact ggacaatgga ttggcaagga cgcctaccat gggctggctg cactggggagc 180
      gcttcatgtg caaccttgac tgccaggaag agccagattc ctgcatcagt gagaagctct 240
      tcatggagat ggcagagctc atggctcag aaggctggaa ggatgcaggt tatgagtacc 300
      tctgcattga tgactgttgg atggctcccc aaagagattc agaaggcaga cttcaggcag 360
      acctcagcg ctttcctcat gggattcgcc agctagctaa ttatgttcac agcaaaggac 420
      tgaagctagg gatattatgca gatgttgaa ataaaacctg cgcaggcttc cctgggagtt 480
      ttggatacta cgacattgat gccagacct ttgctgactg gggagtagat ctgctaaaat 540
10     ttgatggttg ttactgtgac agtttgaaa atttggcaga tggttataag cacatgtcct 600
      tggccctgaa taggactggc agaagcattg tgtactcctg tgagtggcct ctttatatgt 660

      ggccctttca aaagcccaat tatacagaaa tccgacagta ctgcaatcac tggcgaaatt 720
      ttgctgacat tgatgattcc tggaaaagta taaagagtat cttggactgg acatctttta 780
      accaggagag aattgttgat gttgctggac caggggggtg gaatgacca gatatgttag 840
15     tgattggcaa ctttggcctc agctggaatc agcaagtaac tcagatggcc ctctgggcta 900
      tcatggctgc tcctttattc atgtctaatg acctccgaca catcagccct caagccaaag 960
      ctctccttca ggataaggac gtaattgcca tcaatcagga ccccttgggc aagcaagggt 1020
      accagcttag acagggagac aactttgaag tgtgggaacg acctcttca ggcttagcct 1080
      gggctgtagc tatgataaac cggcaggaga ttggtggacc tcgctcttat accatcgag 1140
20     ttgcttccct gggtaaagga gtggcctgta atcctgcctg cttcatcaca cagctcctcc 1200
      ctgtgaaaag gaagctaggg ttctatgaat ggacttcaag gttaagaagt cacataaatc 1260
      ccacaggcac tgttttgctt cagctagaaa atacaatgca gatgtcatta aaagacttac 1320
      tttaaaaaaa aaaaaaactc gag                                     1343

```

25 <210> 4  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 4

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 634 317 T3

5 Leu<sub>1</sub> Asp Asn Gly Leu<sub>5</sub> Ala Arg Thr Pro Thr<sub>10</sub> Met Gly Trp Leu His Trp  
 Glu Arg Phe Met<sub>20</sub> Cys Asn Leu Asp Cys<sub>25</sub> Gln Glu Glu Pro Asp<sub>30</sub> Ser Cys  
 Ile Ser Glu<sub>35</sub> Lys Leu Phe Met Glu<sub>40</sub> Met Ala Glu Leu Met Val<sub>45</sub> Ser Glu  
 Gly Trp<sub>50</sub> Lys Asp Ala Gly Tyr<sub>55</sub> Glu Tyr Leu Cys Ile<sub>60</sub> Asp Asp Cys Trp  
 Met<sub>65</sub> Ala Pro Gln Arg Asp<sub>70</sub> Ser Glu Gly Arg Leu<sub>75</sub> Gln Ala Asp Pro Gln<sub>80</sub>  
 10 Arg Phe Pro His Gly<sub>85</sub> Ile Arg Gln Leu Ala<sub>90</sub> Asn Tyr Val His Ser<sub>95</sub> Lys  
 Gly Leu Lys Leu<sub>100</sub> Gly Ile Tyr Ala Asp<sub>105</sub> Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala  
 Gly Phe Pro<sub>115</sub> Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe  
 15 Ala Asp Trp<sub>130</sub> Gly Val Asp Leu<sub>135</sub> Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp  
 Ser Leu Glu Asn Leu Ala<sub>150</sub> Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu<sub>160</sub>  
 20 Asn Arg Thr Gly Arg<sub>165</sub> Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr<sub>175</sub>  
 Met Trp Pro Phe<sub>180</sub> Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys  
 Asn His Trp<sub>195</sub> Arg Asn Phe Ala Asp<sub>200</sub> Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile  
 25 Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr<sub>215</sub> Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp  
 Val Ala Gly Pro Gly<sub>230</sub> Gly Trp Asn Asp Pro Asp<sub>235</sub> Met Leu Val Ile Gly<sub>240</sub>  
 Asn Phe Gly Leu Ser<sub>245</sub> Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp  
 30 Ala Ile Met Ala<sub>260</sub> Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile  
 Ser Pro Gln Ala<sub>275</sub> Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile  
 Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys<sub>295</sub> Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp  
 35 Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly<sub>315</sub> Leu Ala Trp Ala Val  
 Ala Met Ile Asn Arg<sub>325</sub> Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile  
 40 Ala Val Ala Ser<sub>340</sub> Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe  
 Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Gln Trp  
 Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu  
 45 Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu

385

390

395

50 <210> 5  
 <211> 1197  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 5

60

65

ES 2 634 317 T3

```

ctggacaatg gattggcaag gacgcctacc atgggctggc tgcactggga gcgcttcatt 60
tgcaaccttg actgccagga agagccagat tcctgcatca gtgagaagct ctccatggag 120
atggcagagc tcatgggtctc agaaggctgg aaggatgcag gttatgagta cctctgcatt 180
gatgactggt ggatggctcc ccaaagagat tcagaaggca gacttcaggc agaccctcag 240
5 cgctttcctc atgggattcg ccagctagct aattatgttc acagcaaagg actgaagcta 300
gggatttatg cagatgttgg aaataaaacc tgcgcaggct tccctgggag ttttggatac 360
tacgacattg atgccagac ctttgctgac tggggagtag atctgctaaa atttgatggt 420
tgttactgtg acagtttggg aaatttggca gatggttata agcacatgtc cttggccctg 480
aataggactg gcagaagcat tgtgtactcc tgtgagtggc ctctttatat gtggcccttt 540
10 caaaagccca attatacaga aatccgacag tactgcaatc actggcgaaa ttttgctgac 600
attgatgatt cctggaaaag tataaagagt atcttggact ggacatcttt taaccaggag 660
agaattgttg atgttgctgg accagggggt tggaatgacc cagatatggt agtgattggc 720
aactttggcc tcagctggaa tcagcaagta actcagatgg cctctctggc tatcatggct 780
gctcctttat tcatgtctaa tgacctcga cacatcagcc ctcaagccaa agctctcctt 840
15 caggataagg acgtaattgc catcaatcag gacccttgg gcaagcaagg gtaccagctt 900
agacagggag acaactttga agtgtgggaa cgacctctct caggcttagc ctgggctgta 960
gctatgataa accggcagga gattgttggg cctcgtctct ataccatcgc agttgcttcc 1020
ctgggtaaag gagtggcctg taatcctgcc tgcttcatca cacagtcct cctgtgaaa 1080
aggaagctag ggttctatga atggacttca aggttaagaa gtcacataaa tcccacaggc 1140
actgttttgc ttcagctaga aaatacaatg cagatgtcat taaaagactt acttttaa 1197

20 <210> 6
    <211> 22
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25 <220>
    <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

    <400> 6
30 ctgggctgta gctatgataa ac 22

    <210> 7
    <211> 21
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

35 <220>
    <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

    <400> 7
40 tctagctgaa gcaaaacagt g 21

    <210> 8
    <211> 19
    <212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

50 <400> 8
    attggtccgc ccctgaggt 19

    <210> 9
    <211> 20
55 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

60 <400> 9
    tgatgcagga atctggctct 20

    <210> 10
65 <211> 35

```

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR  
  
 <400> 10  
 ttttgatcc ctcgaggaca tgattattg actag 35  
  
 10 <210> 11  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR  
  
 <400> 11  
 ttttgatcc cgtgtcaagg acggtgac 28  
 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR  
  
 <400> 12  
 30 ttttgatcc accatggcta 20  
  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR  
  
 <400> 13  
 40 ttttgccggc actgccctct tga 24  
  
 <210> 14  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR  
 50  
 <400> 14  
 ttttcagctg gacaatgat tggc 24  
  
 <210> 15  
 55 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR  
  
 <400> 15  
 ttttgctagc tggcgaatcc 20  
  
 65 <210> 16

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

5 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 16  
 ttttgatcc ggtgccata ggtttcca 30

10 <210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 17  
 ttttgatcc gcagtcgtgg ccagtacc 28

20 <210> 18  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligo inserción

30 <400> 18  
 ctagtctag ga 12

<210> 19  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

40 <400> 19  
 ttttgacac agagcctcgc ct 22

45 <210> 20  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Promotor de colágeno parcial

<400> 20  
 ttttgatcc ggtgagctgc gagaatagcc 30

55 <210> 21  
 <211> 76  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Promotor de colágeno parcial

65 <400> 21

# ES 2 634 317 T3

gggccccag cccagccct cccattgggtg gaggcccttt tggaggcacc ctagggccag 60  
gaaacttttg ccgtat 76

5 <210> 22  
<211> 69  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Promotor de colágeno parcial

<400> 22

15 aaatagggca gatccgggct ttattatattt agcaccacgg ccgccgagac cgcgtccgcc 60  
ccgcgagca 69

<210> 23  
<211> 86  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Promotor de colágeno parcial

25 <400> 23

tgccctatatt atacggcaaa agtttcctgg ccctaggggtg cctccaaaag ggccctccacc 60  
aatgggaggg ctggggctgg gggccc 86

30 <210> 24  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR

40 <400> 24  
cgcggggcgg acgcggtctc ggcggccgtg gtgctaaaat aataaagccc ggatc 55

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5           **1.** Una preparación de  $\alpha$ -Gal A glicosilada humana que tiene una carga de oligosacáridos aumentada, en donde entre el 35% y el 85% de los oligosacáridos se cargan por la adición de :
- (i) uno a cuatro residuos de ácido siálico en glicanos complejos,  
                  (ii) uno a dos restos de fosfato en glicanos alta-manosa, o  
                  (iii) un único fosfato y un único ácido siálico en glicanos híbridos,
- 10           para su uso en el tratamiento de deficiencia de  $\alpha$ -Gal A a una dosis semanal o bisemanal de entre 0,05 mg a 5,0 mg de la preparación de  $\alpha$ -Gal A por kg de peso corporal de un sujeto.
- 15           **2.** La preparación de  $\alpha$ -Gal A para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos el 50% de los oligosacáridos están cargados.
- 20           **3.** La preparación de  $\alpha$ -Gal A para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la enzima  $\alpha$ -Gal A contiene aproximadamente un 15% de estructuras neutras (alta-manosa e híbridas), aproximadamente un 16% de glicanos fosforilados, y aproximadamente un 67% de glicanos complejos con de 2 a 4 residuos de ácido siálico.
- 25           **4.** La preparación de  $\alpha$ -Gal A para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enzima  $\alpha$ -Gal A contiene tres sitios de glicosilación N-enlazados, de los que dos sitios de glicosilación N-enlazados han sido procesados a glicanos complejos y el tercer sitio está ocupado por un glicano alta-manosa, el 50% de los cuales ha sido modificado por fosforilación específica del encima para producir tanto especies monofosforiladas como difosforiladas.
- 30           **5.** La preparación de  $\alpha$ -Gal A para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en donde dicha preparación de  $\alpha$ -Gal A se produce en células HT-1080.
- 35           **6.** La preparación de  $\alpha$ -Gal A para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la preparación de  $\alpha$ -Gal A se purifica a al menos un 99,5% de homogeneidad, como se mide por SDS-PAGE o HPLC de fase inversa, en donde dicha preparación comprende varias glicofomas de  $\alpha$ -Gal A y tiene una actividad específica de al menos  $3.0 \times 10^6$  unidades/mg de proteína.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

CTGGGCTGTAGCTATGATAAAACCGGCAGGA  
GATTGGTGGACCTCGCTCTTATAACCATCGCA  
GTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTA  
ATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT  
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGA  
CTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCAC  
AGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGA

**FIG. 1**

ATTGGTCCGCCCTGAGGTTAATCTTAAAAG

SacII

CCCAGGTTACCCGCGGAAATTTATGCTGTC

CGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACC

CAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCT

TCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATC

CCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTG

NcoI

GCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCAC

TGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCC

AGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCA

**FIG. 2**

```

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

```

FIG. 3

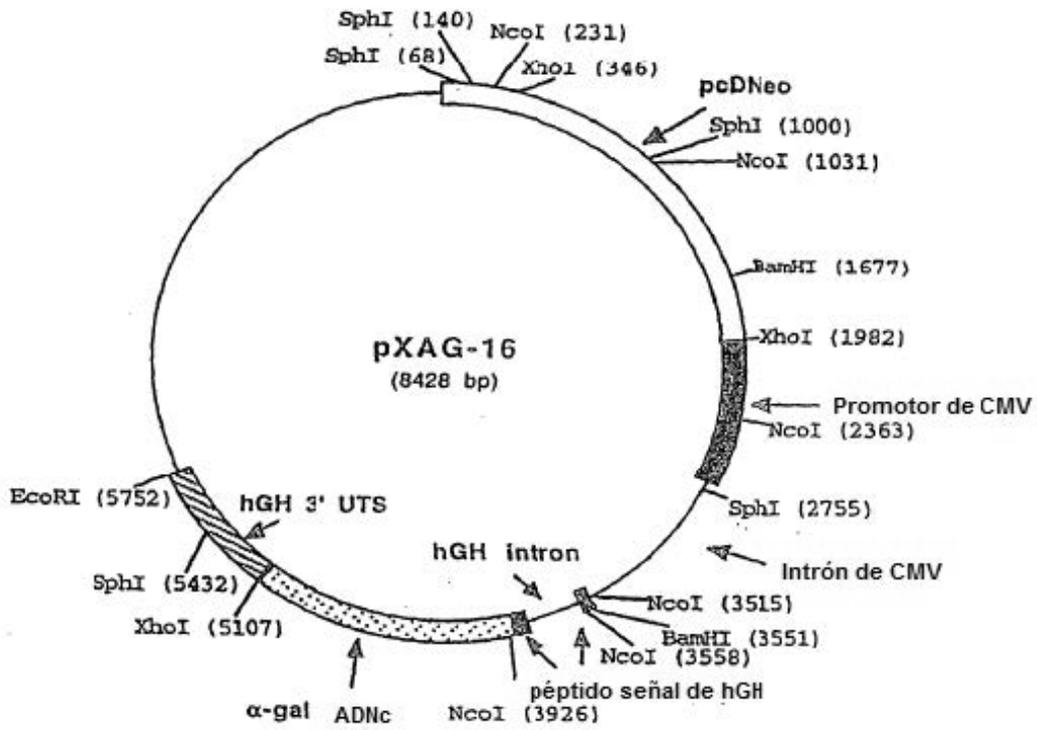


FIG. 4

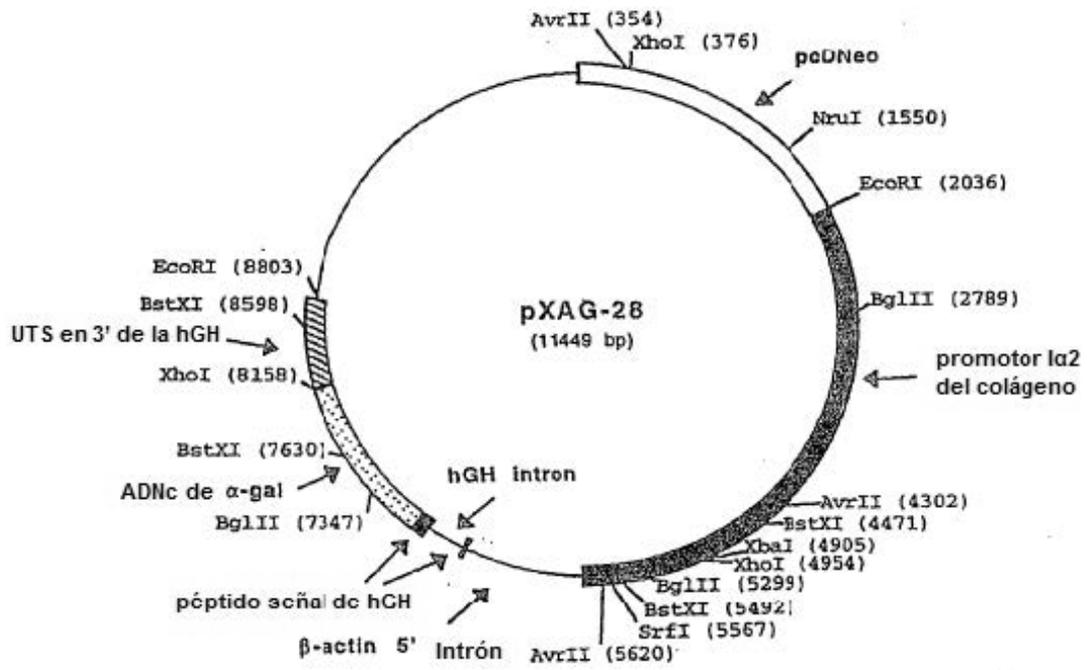


FIG. 5

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

FIG. 6

```

1 CTGGACAATG GATTGCCAAG GACGCCCTACC ATGGGCTGGC TOCACTGGGA GCGCTTCATG
61 TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAAGCT CTTTCATGGAG
121 ATGCCAGAGC TCATGGTCTC AQAAGGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT
181 GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAGAGAT TCAGAAAGCA GACTTCAGGC AGACCCCTCAG
241 CGCTTTCCTC ATGGGATTGG CCACTAGCT AATTATGTTT ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA
301 GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCCAGGCT TCCCTGGAG TTTTGGATAC
361 TACGACATTO ATGCCAGAC CTTTGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGOT
421 TGTTACTGTG ACAGTTTGGG AAATTTGGCA GATGTTATA AGCACATGTC CTTGGCCCTG
481 AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGACTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT
541 CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTCTGAC
601 ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTGGACT GGACATCTTT TAACCAAGAG
661 AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAAAGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC
721 AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAOCAAAGTA ACTCAGATGG CCCTCTGGCC TATCATGGCT
781 GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAAGCAA AGCTCTCCTT
841 CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAAGCAAAG GTACCAGCTT
901 AGACAAGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA
961 GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCCTCTT ATACCATGCG AGTTCCTCC
1021 CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAOTCCT CCCTGTGAAA
1081 AGGAAAGCTAG GATTCTATGA ATGACTTCA AGGTAAAGAA GTCACATAAA TCCACAGGC
1141 ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAT TAAAAGACTT ACTTTAA

```

FIG. 7

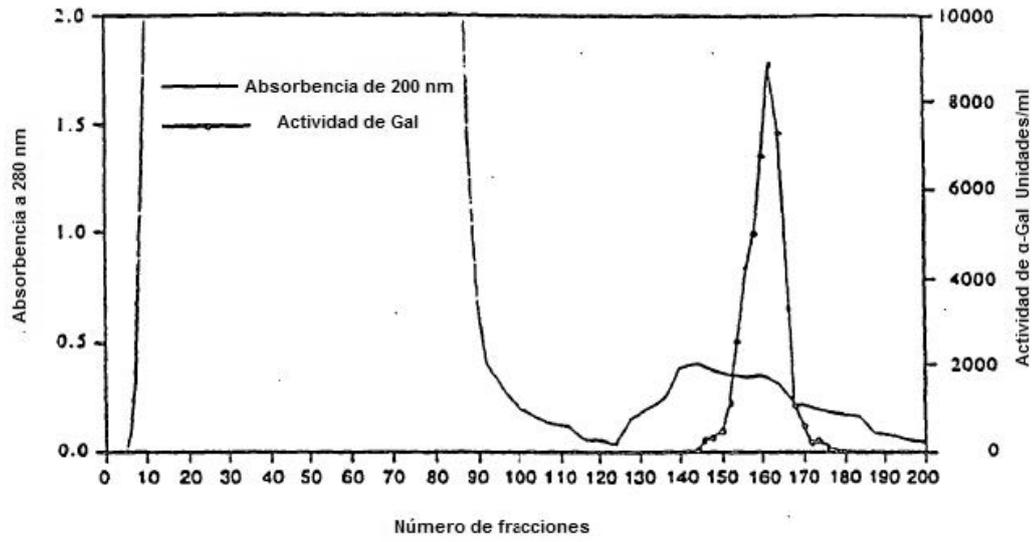
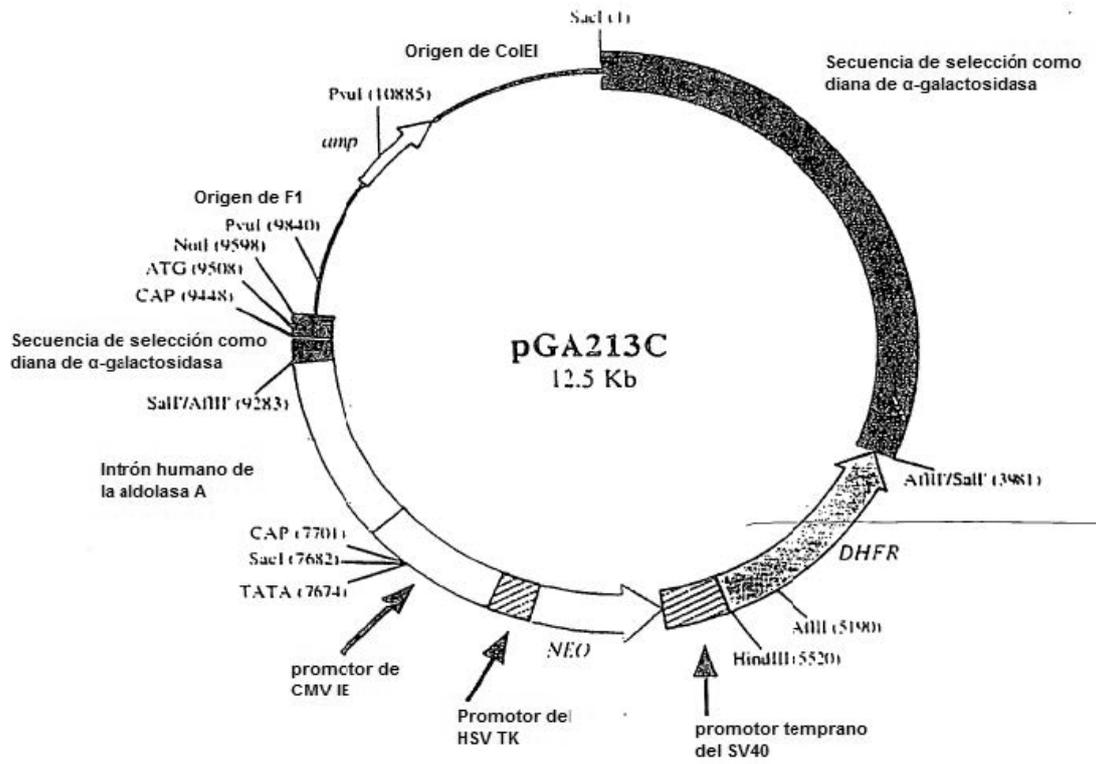


FIGURA 8

Figura 9 Constructo de activación de genes de  $\alpha$ -galactosidasa A pGA213C



Activación de la locus de  $\alpha$ -galactosidasa A humana por recombinación homóloga

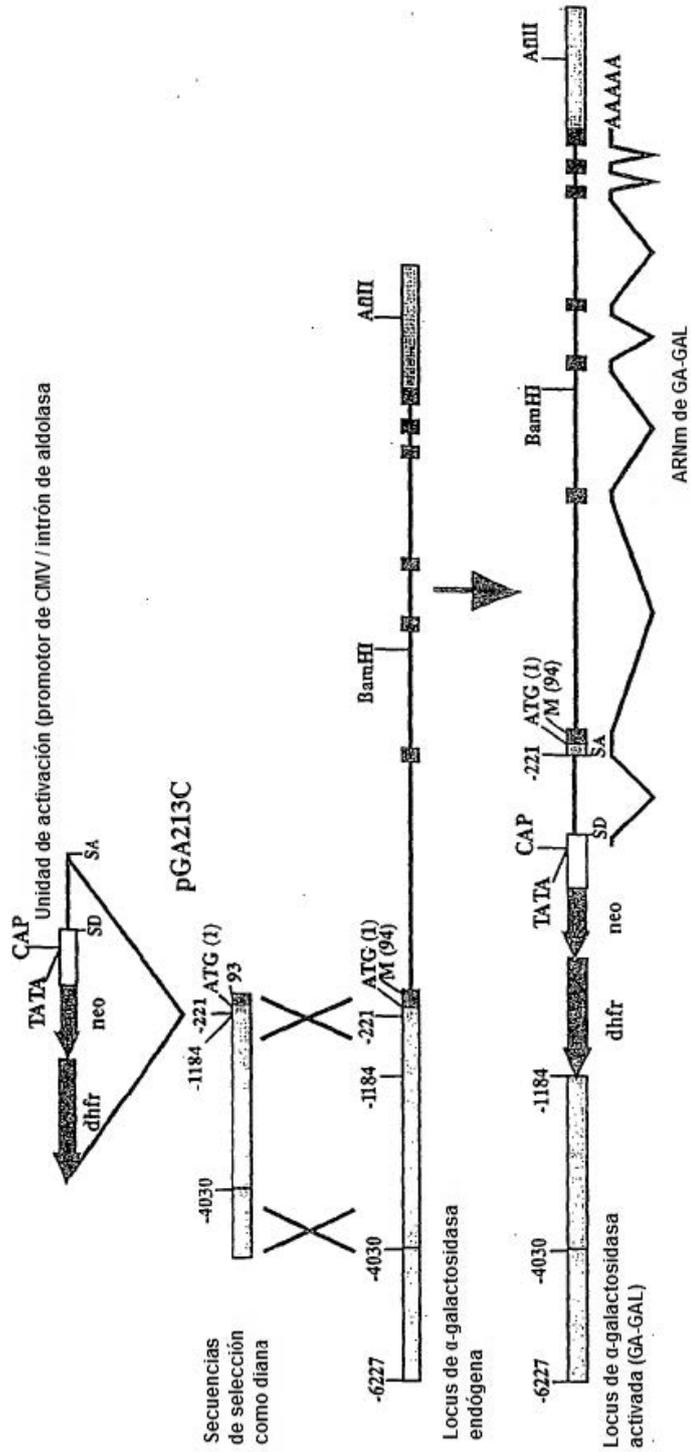


FIGURA 10