

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 082**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 11/00 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2013 PCT/US2013/052939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013 E 13747600 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2880156**

54 Título: **Proteínas desfosforiladas de la enfermedad de depósito lisosómico y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

31.07.2012 US 201261677959 P

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

19.12.2017

73 Titular/es:

**BIOASIS TECHNOLOGIES INC (100.0%)
130- 10691 Shellbridge Way
Richmond BC V6X 2W8, CA**

72 Inventor/es:

**VITALIS, TIMOTHY Z. y
GABATHULER, REINHARD**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 647 082 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas desfosforiladas de la enfermedad de depósito lisosómico y métodos de uso de las mismas

Antecedentes

Campo técnico

5 La presente invención se refiere en general a las formas desfosforiladas de las proteínas de la enfermedad de depósito lisosómico (LSD), incluyendo las formas desfosforiladas de iduronato-2-sulfatasa (IDS, o I2D), que tienen una mayor capacidad de atravesar o penetrar la barrera hematoencefálica (BBB) en relación con las formas fosforiladas de la proteína, y conjugados p97 de las mismas. También se incluyen composiciones que comprenden dichas proteínas de LSD desfosforiladas y conjugados p97, y métodos de uso de las mismas, por ejemplo, para
10 tratar una o más enfermedades de depósito lisosómico, como el síndrome de Hunter (o MPS tipo (II).

Descripción de la técnica relacionada

15 Las enfermedades de depósito lisosómico (LSD) son el resultado de la ausencia de actividad o de la actividad reducida de enzimas o proteínas específicas en los lisosomas de una célula. Dentro de las células, el efecto de la enzima faltante puede ser visto como una acumulación de «material de depósito» no degradado dentro del lisosoma intracelular.

Esta acumulación hace que los lisosomas se hinchen y funcionen mal, lo que provoca daños celulares y tisulares. Puesto que las enfermedades de depósito lisosómico suelen tener una etiología genética, muchos tejidos carecerán de la enzima en cuestión. Sin embargo, diferentes tejidos sufren la ausencia de la misma enzima de forma diferente. El modo en que un tejido se vería afectado está determinado en cierto modo por el grado en que ese tejido genere el
20 sustrato de la enzima faltante. Los tipos de tejido más sobrecargados por el depósito, a su vez, determinan la forma en que debe administrarse el fármaco al paciente.

Muchas enzimas de la enfermedad de depósito lisosómico han sido identificadas y correlacionadas con sus respectivas enfermedades. Una vez identificada la enzima faltante o deficiente, el tratamiento puede centrarse en el problema de suministrar formas eficaces de reemplazo a los tejidos afectados del paciente.

25 La terapia de reemplazo enzimático (ERT) intravenoso puede ser beneficiosa para las LSD (*por ejemplo*, MPS I, MPS II, MPS III); sin embargo, los medios para mejorar el suministro de la enzima terapéutica al lisosoma en estas enfermedades serían ventajosos en términos de reducción de costes y aumento de la eficacia terapéutica.

Como problema, la barrera hematoencefálica (BBB) bloquea la libre transferencia de muchos agentes de la sangre al cerebro. Por esta razón, no se espera que las LSD que presentan aspectos neurológicos significativos sean tan
30 sensibles a la ERT por vía intravenosa. Para dichas enfermedades, los métodos de mejorar el suministro de la enzima a través de la BBB y en los lisosomas de las células afectadas serían altamente deseables.

<Daniele et al., Biochimica Et Biophysica Acta. V1588, no 3, pp203-209, 2002, describe una actualización de IDS recombinantes en células neuronales y gliales in vitro. Bielicki, Biochemical Journal, V289, p241, 1993 describe una formulación estable que comprende una proteína IDUronato-2-sulfatasa.>

35 Breve resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Las realizaciones de la presente invención incluyen los polipéptidos de la enfermedad de depósito lisosómico (LSD) aislados sustancialmente desfosforilados, en relación con una proteína de LSD de control correspondiente expresada (o producida) en una célula de mamífero, como una célula humana. En determinadas realizaciones, el
40 polipéptido de LSD está desfosforilado al menos aproximadamente un 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100%, en relación con la proteína de LSD correspondiente.

En realizaciones específicas, el polipéptido de LSD comprende uno o más N-glicanos de oligomanosa. Por ejemplo, determinados polipéptidos de LSD comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 N-glicanos de oligomanosa. Se describen polipéptidos de LSD que tienen al menos aproximadamente un 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100% del
45 número o cantidad de N-glicanos de oligomanosa que la proteína de LSD correspondiente. En realizaciones específicas, el polipéptido de LSD está sustancialmente libre de residuos de manosa-6-fosfato (M6P) del o los N-glicanos de oligomanosa, en relación a una proteína de LSD correspondiente expresada (o producida) en una célula de mamífero. En algunos aspectos, el polipéptido de LSD está desfosforilado por digestión enzimática con una fosfatasa ácida o una fosfatasa alcalina.

50 El polipéptido de LSD es un polipéptido humano.

El polipéptido de LSD es iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana, o un fragmento activo o variante de la misma. En algunos aspectos, la IDS humana tiene una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o un 100% idéntica a la ID SEC N° 2, o comprende, se compone básicamente, o se compone de ID SEC N° 2. En algunos aspectos, la IDS humana comprende uno o más N-glicanos de oligomanosa. En aspectos
55 específicos, la IDS humana comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 N-glicanos de oligomanosa. En algunos aspectos, la IDS humana tiene al menos aproximadamente un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100% del número o

cantidad de N-glicanos de oligomanosa que un iduronato-2-sulfatasa humano tipo salvaje correspondiente producido (expresado) en una célula de mamífero, como una célula humana (*por ejemplo*, célula HT-1080). En algunas realizaciones, uno o más N-glicanos de oligomanosa están sustancialmente desfosforilados, en relación con los N-glicanos de oligomanosa de IDS humanas correspondientes producidos (expresados) en una célula de mamífero, como una célula humana. En algunos aspectos, uno o más N-glicanos de oligomanosa están desfosforilados al menos aproximadamente un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100%.

En algunas realizaciones, la IDS humana está sustancialmente libre de residuos de manosa-6-fosfato (M6P), en relación con las IDS correspondientes producidas en una célula de mamífero. En aspectos específicos, la IDS humana comprende un contenido de M6P inferior a aproximadamente 1,2 pmol de proteína IDS M6P/pmol. En determinados aspectos, la IDS humana comprende un contenido de M6P inferior a aproximadamente 1,2 pmol de proteína IDS M6P/pmol. En aspectos específicos, la IDS humana comprende un contenido de M6P inferior a aproximadamente 0,15 pmol de proteína IDS M6P/pmol.

En determinadas realizaciones, la proteína correspondiente es una proteína de tipo salvaje, como una proteína IDS o IDS tipo salvaje humana. La proteína correspondiente para IDS sustancialmente desfosforilada es idursulfasa producida en la línea celular del fibrosarcoma HT-1080.

También se incluyen conjugados, que comprenden un polipéptido p97 que está enlazado covalentemente u operativamente a un polipéptido de LSD sustancialmente desfosforilado que se describe en este documento, para formar un conjugado p97.

También se incluyen composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido de una enfermedad de depósito lisosómico (LSD) aislado o conjugado p97 que se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describen métodos de tratamiento de la enfermedad de depósito lisosómico (LSD) en el sujeto que lo necesita, que comprenden la administración al sujeto de una composición [*por ejemplo*, una composición farmacéutica] de proteína de LSD sustancialmente desfosforilada, o el conjugado que se describe en este documento.

En determinados métodos, la LSD se selecciona de una o más mucopolisacaridosis tipo (II) (síndrome de Hunter), mucopolisacaridosis tipo (I) (síndrome de Hurler), aspartilglucosaminuria, enfermedad de depósito de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de célula globoide, enfermedad de Krabbe, enfermedad de depósito de glucógeno II, enfermedad de Pompe, GMI-gangliosidosis tipos I/II/III, GM2-gangliosidosis tipo I, enfermedad de Tay Sachs, GM2-gangliosidosis tipo II, enfermedad de Sandhoff, GM2-gangliosidosis, ct-manosidosis tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolisacaridosis tipo I, sialidosis tipos I/II, mucopolisacaridosis enfermedad celular tipo I/II/III, mucopolisacaridosis polidistrofia pseudo-Hurler tipo NIC, mucopolisacaridosis tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis tipo NIB, mucopolisacaridosis tipo INC, mucopolisacaridosis tipo MID, mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis neuronal cerioidea, CLN1 enfermedad de Batten, enfermedad de Niemann-Pick tipos NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler, y enfermedad de depósito de ácido siálico.

En realizaciones específicas, la LSD es mucopolisacaridosis tipo II (síndrome de Hunter), y la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada es iduronato-2-sulfatasa humana.

En otras realizaciones, la LSD es mucopolisacaridosis tipo I (síndrome de Hunter), y la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada es iduronato-L humano.

En algunas realizaciones, la LSD tiene una implicación en el sistema nervioso central (SNC), o el sujeto está en riesgo de desarrollar una implicación en el SNC de la LSD.

También se incluyen métodos de producir una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada, como iduronato-2-sulfatasa (IDS) humano, que comprende producir recombinantemente la proteína de LSD en una línea celular de mamífero, opcionalmente en una línea celular humana, y tratar la proteína de LSD producida recombinantemente con una fosfatasa durante un tiempo suficiente para reducir el contenido de manosa-6-fosfato (M6P) de la proteína de LSD mediante al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 99%, en relación a la proteína de LSD no tratada producida en la misma línea celular. En realizaciones específicas, la proteína de la LSD es IDS humana o IDU humana.

La línea celular humana es una línea celular de fibrosarcoma HT-1080 y la proteína es IDS humana. En algunos aspectos, la IDS humana comprende o se compone de la secuencia de aminoácidos ID SEC N° 2. En aspectos específicos, la fosfatasa es una fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP). En aspectos específicos, la CIP está unida a perlas acrílicas.

En algunas realizaciones, la proteína de LSD, como IDS humana, se fusiona en una secuencia de p97 humano. Algunos métodos también comprenden la conjugación de la proteína de LSD, como IDS humana, en un polipéptido p97 humano.

Realizaciones específicas incluyen un polipéptido de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana aislada, donde el polipéptido de IDS humana comprende o se compone de la secuencia de aminoácidos de ID SEC N° 2, o una variante de la misma, y donde el contenido de manosa-6-fosfato (M6P) es inferior a aproximadamente 1,2 pmol de proteína IDS M6P/pmol. En aspectos específicos, el contenido de M6P es inferior a aproximadamente 0,5 pmol de proteína IDS M6P/pmol. En algunos aspectos, el contenido de M6P es aproximadamente de o inferior a aproximadamente 0,15 pmol de proteína IDS M6P/pmol.

Este y otros aspectos de la presente invención serán evidentes al referirse a la siguiente descripción detallada y las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra los niveles de proteínas de prueba acumuladas en el parénquima cerebral de ratones tras la inyección intravenosa (IDS, iduronato-2-sulfatasa; dpIDS, iduronato-2-sulfatasa desfosforilado; MTF-IDS, conjugado de p97-IDS; MTF-dpIDS, conjugado de p97-dpIDS).

La **Figura 2** muestra la distribución de las proteínas de prueba entre el parénquima cerebral (dentro del BBB) y los capilares cerebrales (fuera del BBB) de ratones tras la infección intravenosa.

La **Figura 3** muestra tres tipos de N-glicanos: glicanos de oligomanosa, en los que solo los residuos de manosa están unidos al núcleo; glicanos complejos, en los que las N acetilglucosaminiltransferasas (GlcNAcTs) están unidas al núcleo; y glicanos híbridos, en los que solo los residuos de manosa están unidos al brazo Manal-6 del núcleo y una o dos antenas están en el brazo Manal-3.

La **Figura 4** muestra la producción de proteínas lisosómicas que adquieran un GlcNAc-1-P en C-6 de residuos de manosa en N-glicanos de oligomanosa en la *c/s*-Golgi; la *N*-acetil-glucosamina se extrae en el *trans*-Golgi por una glucosidasa para exponer los residuos de fosfato.

La **Figura 5** muestra la distribución de IDS y dpIDS en el parénquima cerebral, con o sin conjugación en p97 (MTf).

La **Figura 6** muestra la secuencia de aminoácido de idursulfasa (IDS humana) (ID SEC N°2), e indica puntos de N-glicosilación.

Descripción detallada de la invención

Las realizaciones de la presente invención están basadas parcialmente en el descubrimiento de que las formas desfosforiladas de las proteínas de la enfermedad de depósito lisosómico (LSD) como el iduronato-2-sulfatasa (IDS) tienen significativamente una mayor capacidad de transferencia a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y en los tejidos del sistema nervioso central (SNC), en relación con las proteínas fosforiladas normalmente. La conjugación a las secuencias del polipéptido p97 (melanotransferrina) puede mejorar todavía más la transferencia de proteínas de LSD desfosforiladas a través de la BBB y en los tejidos del CNS.

Muchas enzimas lisosómicas se dirigen hacia los lisosomas a través una vía de tráfico especializada que implica la generación de N-glicanos fosforilados. La fase de fosforilación se produce típicamente en el *c/s*-Golgi e implica la transferencia de GlcNAc-1-P en C-6 de residuos de manosa de glicanos reunidos en la oligomanosa. Una glucosidasa en el *trans*-Golgi extrae la *N*-acetilglucosamina para generar residuos de manosa-6-fosfato. Dichos residuos son reconocidos por los receptores de lectina (receptores de manosa-6- fosfato) que transportan la enzima lisosómica a un compartimento acidificado donde se libera del receptor y finalmente termina en un lisosoma. Aquí, se ha descubierto inesperadamente que la extracción de los grupos fosfato de N-glicanos de oligomanosa, por ejemplo, por incubación con fosfatasa ácida, alteran la farmacocinética de las proteínas de la LSD como el iduronato 2-sulfatasa de tal manera que aumenta la transferencia a través de la BBB, pero aún permite el tráfico suficiente a los compartimentos lisosómicos dentro de las células del sistema nervioso central.

Por consiguiente, las proteínas LSD desfosforiladas que se describen en el presente documento y los conjugados p97 relacionados pueden encontrar una gran variedad de usos en la mejora del tratamiento de enfermedades de depósito lisosómico (LSD) a través de la terapia de reemplazo enzimático (ERT), incluyendo, entre otras, aquellas LSD que tienen o que corren el riesgo de tener un componente del SNC o del sistema nervioso general. En realizaciones específicas, la proteína de LSD es una versión sustancialmente desfosforilada de IDS que se conjuga opcionalmente con un polipéptido p97 humano, que se puede utilizar, por ejemplo, para mejorar el tratamiento del síndrome de Hunter en relación con la ERT que utiliza proteína fosforilada normalmente. En otras realizaciones, la proteína de LSD es una versión sustancialmente desfosforilada de IDU que se conjuga opcionalmente con un polipéptido p97 humano, que se puede utilizar, por ejemplo, para mejorar el tratamiento del síndrome de Hurler en relación con la ERT que utiliza proteína fosforilada normalmente. Otras ventajas y beneficios serán evidentes para el experto en la técnica.

Definiciones

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos científicos y técnicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que suele entender el experto en la técnica a la que pertenece el invento. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden ser utilizados en la práctica o prueba de la presente divulgación, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Los artículos «un» y «una» se utilizan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (*es decir*, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Por ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

5 El término «**aproximadamente**» significa una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o un 1% con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

10 En el presente documento, el término «**aminoácido**» se entiende que significa aminoácidos que se producen naturalmente y aquellos que se producen de forma no natural, así como aminoácido análogos y miméticos. Los aminoácidos que se producen de forma natural incluyen los aminoácidos 20 (L) utilizados durante la biosíntesis de proteínas, además de otros, como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina, por ejemplo. Los aminoácidos que no se producen de un modo natural incluyen, por ejemplo, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, los cuales son conocidos para el experto en la técnica. Los aminoácidos análogos incluyen formas modificadas de aminoácidos que se producen de forma natural y no natural. Esas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, la sustitución o reemplazo de los grupos químicos y fracciones en el aminoácido o mediante derivatización del aminoácido. Los aminoácidos miméticos incluyen, por ejemplo, estructuras orgánicas que presentan propiedades funcionalmente similares como las características de carga y separación de carga del aminoácido de referencia. Por ejemplo, una estructura orgánica que imita la arginina (Arg o R) tendría una fracción de carga positiva situada en el espacio molecular similar y con el mismo grado de movilidad que el grupo e-amino de la cadena lateral de aminoácidos Arg que se producen naturalmente. Los miméticos también incluyen estructuras limitadas para mantener el espaciado óptimo y las interacciones de carga del aminoácido o de los grupos funcionales de aminoácidos. El experto en la técnica sabe o puede determinar qué estructuras constituyen aminoácidos análogos y aminoácidos miméticos funcionalmente equivalentes.

25 A lo largo de esta especificación, salvo que el contexto indique lo contrario, las palabras «**comprende**», «**comprenden**», y «**que comprende**», se entiende que implican la inclusión de un determinado paso o elemento o grupo de pasos o elementos, pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos. El término «**compuesto por**» significa que incluye y que está limitado a, lo que siga a la frase «compuesto por». Por tanto, el término «compuesto por» indica que los elementos que se enumeran son necesarios u obligatorios y que no puede haber otros elementos presentes. El término «**compuesto básicamente de**» se entiende que incluye cualquier elemento enumerado, después de dicho término, y se limita a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o a la acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase «compuesto básicamente de» indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan materialmente a la actividad o a la acción de los elementos enumerados.

40 El término «**conjugado**» se refiere a la entidad formada como resultado de la fijación o conexión covalente o no covalente de un agente o de otra molécula, *por ejemplo*, una molécula biológicamente activa, en un polipéptido p97. Un ejemplo de polipéptido conjugado es una «**proteína de fusión**» o «**polipéptido de fusión**», es decir, un polipéptido que se crea mediante la unión de dos o más secuencias de codificación, que se codificaron originalmente para polipéptidos separados; la conversión de las secuencias de codificación unidas da como resultado un solo polipéptido de fusión, de forma típica con propiedades funcionales derivadas de cada uno de los polipéptidos separados.

En el presente documento, los términos «**función**» y «**funcional**» y similares hacen referencia a una función biológica, enzimática o terapéutica.

45 El término «**glicano**» se refiere a un polisacárido u oligosacárido que normalmente incluye O-glucosídicos de monosacáridos. Los glicanos puede ser homo o heteropolímeros de residuos monosacáridos, y/o pueden ser lineales o ramificados. La glicosilación incluye la reacción de co-traslación o post-traslación en la que un glicano se une a un grupo funcional de proteínas. Entre los ejemplos de glicanos asociados a proteínas se incluyen N-glicanos, N-glicanos, fosfoglicanos, C-glicanos, y anclajes glicofosfatidilinositol (GPI). Los N-glicanos están conectados a un nitrógeno de cadena lateral de asparagina o arginina y los O-glicanos están conectados a las cadenas laterales de hidroxioxígeno de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina. Los N-glicanos comparten una secuencia de azúcar de núcleo común $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$, y se clasifican en tres tipos: (1), oligomanosa, en la que solo los residuos de manosa están unidos al núcleo; (2) complejos, en los que las «**antenas**» iniciadas por N-acetilglucosaminiltransferasas (GlcNAcTs) están unidas al núcleo; y (3) híbridos, en los que solo los residuos de manosa están unidos al brazo $\text{Man}\alpha 1-6$ del núcleo y una o dos antenas están en el brazo $\text{Man}\alpha 1-3$ (véase la Figura 3). La Figura 4 muestra la producción de proteínas lisosómicas (*por ejemplo*, proteínas de LSD) que adquieren un GlcNAc-1- P a C-6 de residuos de manosa en N-glicanos de oligomanosa en la cis-Golgi; la N-acetilglucosamina se retira en el *trans-Golgi* por una glucosidasa, exponiendo así los residuos de manosa-6-fosfato que son reconocidos por un receptor de manosa-6-fosfato y dirigidos a un compartimento pre-lisosómico acidificado.

El término **«homología»** se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras. La homología se puede determinar utilizando programas de comparación de secuencias como GAP (Deveraux *et al.*, *Nucleic Acids Research*. 12, 387-395, 1984). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferentes a las aquí citadas podrían compararse por la inserción de espacios en la alineación, dichos espacios estarían determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

El término **«aislado»** significa el material que está sustancialmente o básicamente libre de los componentes que lo acompañan normalmente en su estado original. Por ejemplo, un «péptido aislado» o un «polipéptido aislado» y similares, tal como se utilizan en el presente documento, incluye el aislamiento *in vitro* y/o la purificación de una molécula de un péptido o polipéptido de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula; es *decir*, no está significativamente asociado con sustancias *in vivo*.

El término **«enlace»**, **«fracción de enlace»** o **"L"** se utiliza aquí para hacer referencia a un enlace que se puede utilizar para separar un fragmento de polipéptido p97 de un agente de interés, o para separar un primer agente de otro agente, por ejemplo donde dos o más agentes están unidos para formar un conjugado p97. El enlace puede ser fisiológicamente estable o puede incluir un enlace liberable como un enlace enzimáticamente degradable (*por ejemplo*, enlaces divisibles proteolíticamente). En determinados aspectos, el enlace puede ser un enlace de un péptido, por ejemplo, como parte de una proteína de fusión p97. En algunos aspectos, el enlace puede ser un enlace no péptido o un enlace no proteínico. En algunos aspectos, el enlace puede ser una partícula, por ejemplo, una nanopartícula.

Los términos **«modular»** y **«alterar»** incluyen «aumentar», «mejorar» o «estimular», así como «disminuir» o «reducir», de forma típica en una cantidad estadísticamente significativa o fisiológicamente importante o grado en relación a un control. Una cantidad **«incrementada»**, **«estimulada»** o **«mejorada»** es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa», y puede incluir un aumento de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (*por ejemplo*, 500,1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y comas decimales intermedios y superiores a 1, *por ejemplo*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por la no composición (*por ejemplo*, la ausencia de polipéptido de conjugado de la invención) o una composición de control, muestra o sujeto de prueba. Una cantidad **«disminuida»** o **«reducida»** es típicamente una cantidad **«estadísticamente significativa»**, y puede incluir una disminución de un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o un 100% en la cantidad producida por la no composición o una composición de control, incluyendo todos los números enteros intermedios. En un ejemplo no limitativo, un control podría comparar la actividad, como la cantidad o frecuencia de transporte/suministro a través de la barrera hematoencefálica, la frecuencia y/o los niveles de distribución al tejido del sistema nervioso central, y/o el $C_{m\acute{a}x}$ para el plasma, los tejidos del sistema nervioso central, o cualquier otro tejido que no sea del sistema nervioso central sistémico o periférico, de una proteína de depósito lisosómico sustancialmente desfosforilada (dp) que se describe en el presente documento en relación a una versión fosforilada normalmente de esa proteína, o de un conjugado polipéptido p97 en relación con el polipéptido aislado. En este documento se describen otros ejemplos de comparaciones y cantidades «estadísticamente significativas».

En determinadas realizaciones, la **«pureza»** de cualquier polipéptido dado (*por ejemplo*, una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada, un conjugado p97) en una composición se puede definir específicamente. Por ejemplo, determinadas composiciones pueden comprender un polipéptido que sea al menos un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% puro, incluyendo todos los decimales intermedios, tal como se midan, por ejemplo y sin limitación, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), un método bien conocido de cromatografía de columna que se utiliza frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos.

Los términos **«polipéptido»** y **«proteína»** y **«enzima»** se utilizan indistintamente en este documento para hacer referencia a un polímero de residuos aminoácidos y variantes y análogos sintéticos del mismo. Por tanto, estos términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos que no se producen de forma natural, como un químico análogo de un aminoácido que se produce de forma natural correspondiente, así como aquellos polímeros de aminoácidos que se producen naturalmente. Los polipéptidos que aquí se describen no están limitados a una longitud específica del producto; por tanto, péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido, y dichos términos se pueden utilizar indistintamente en este documento, a menos que se indique específicamente lo contrario. Los polipéptidos que aquí se describen también puede incluir modificaciones post-expresión, como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto las que se producen naturalmente como las que no lo hacen. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia, fragmento, variante, o derivado de la misma.

Una unión **«fisiológicamente divisible»** o **«hidrolizable»** o **«degradable»** es una unión que reacciona con el agua (*es decir*, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de una unión a hidrolizar en agua dependerá no solo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes conectados a estos átomos centrales. Los enlaces hidrolíticamente apropiados inestables o débiles incluyen, entre otros: éster carboxilado, éster fosfato, anhídrido, acetal, cetal, aciloxialquil éter, imina, ortoéster, tio éster, tiol éster, carbonato, hidrazona, péptidos y oligonucleótidos.

Un «**enlace liberable**» incluye, a título meramente enunciativo, un enlace fisiológicamente divisible y un enlace enzimáticamente degradable. Por tanto, un «enlace liberable» es un enlace que puede sufrir hidrólisis espontánea o una división por algún otro mecanismo (*por ejemplo*, catalizado por enzimas, catalizado por ácido, base-catalizado, etc.) en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, un «enlace liberable» puede implicar una reacción de eliminación que tiene una abstracción base de un protón, (*por ejemplo*, un átomo de hidrógeno ionizable, Ha), como la fuerza impulsora. A efectos de este documento, un «enlace liberable» es sinónimo de un «enlace degradable». Un «**enlace enzimáticamente degradable**» incluye un enlace, *por ejemplo*, la secuencia de aminoácidos, que está sujeta a la degradación por una o más enzimas, *por ejemplo*, peptidasas o proteasas. En realizaciones específicas, un enlace liberable tiene una vida media con un pH de 7,4, 25 °C, *por ejemplo*, un pH fisiológico, temperatura del cuerpo humano (*por ejemplo*, en vivo), de aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas o aproximadamente 96 horas o menos.

El término «**secuencia de referencia**» se refiere generalmente a una secuencia de codificación de ácido nucleico o a una secuencia de aminoácidos, a la que se compara otra secuencia. Todas las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos que aquí se describen se incluyen como secuencias de referencias, incluyendo aquellas descritas por su nombre y aquellas descritas en el listado de secuencias.

Los términos «**identidad de secuencia**» o, por ejemplo, que componen una «secuencia idéntica en un 50% a», en el presente documento, hacen referencia al grado en que esas secuencias son idénticas sobre una base de nucleótido por nucleótido o sobre una base de un aminoácido por un aminoácido a través de una ventana de comparación. Por tanto, se puede calcular un «porcentaje de identidad de secuencia» comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a través de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácidos nucleicos idénticos (*por ejemplo*, A, T, C, G, I) o residuo de aminoácidos idénticos (*por ejemplo*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se producen en ambas secuencias para obtener el número de posiciones que coinciden, dividiendo el número de posiciones que coinciden por el número total de posiciones en la ventana de comparación (*es decir*, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o un 100% de identidad de secuencia para cualquiera de las secuencias de referencia descritas en este documento (*véase, por ejemplo*, el listado de la secuencia), de forma típica donde la variante del polipéptido mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen «secuencia de referencia», «ventana de comparación», «identidad de secuencia», «porcentaje de identidad de secuencia» e «identidad sustancial». Una «secuencia de referencia» tiene al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y a menudo al menos 25 unidades monoméricas, que incluyen residuos de aminoácidos y nucleótidos, en longitud. Ya que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (*es decir*, solo una parte de la secuencia polinucleótida completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre las dos comparaciones de secuencias polinucleótidas entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente por la comparación de las secuencias de los dos polinucleótidos a través de una «ventana de comparación» para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una «ventana de comparación» hace referencia a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias queden óptimamente alineadas. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (*es decir*, espacios) de aproximadamente un 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse a través de implementaciones de algoritmos informatizados (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA Wisconsin en la versión 7.0 del paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE.UU.) o mediante inspección y una mejor alineación (*es decir*, lo que aporte el porcentaje de homología más alto a través de la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia de programas BLAST descritos, por ejemplo, por Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3389, 1997. Se puede encontrar un debate detallado del análisis de secuencias en la unidad 19,3 de Ausubel *et al.*, «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15.

El término «**estadísticamente significativas**», significa que es poco probable que el resultado se haya producido por casualidad. La significación estadística se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Las medidas utilizadas comúnmente de significación incluyen el valor p que es la frecuencia o la probabilidad con la que se producirá el evento observado, si la hipótesis nula fuese cierta. Si el valor p obtenido es menor que el nivel de significación, entonces se rechaza la hipótesis nula. En los casos más simples, el nivel de significación se define en un valor p de 0,05 o menos.

El término «**solubilidad**» se refiere a la propiedad de un agente como un polipéptido de disolverse en un disolvente líquido y formar una solución homogénea. La solubilidad se expresa de forma típica como una concentración, o bien mediante la masa de soluto por unidad de volumen de disolvente (g) de soluto por kg de disolvente, (g) por dL (100 mL), mg/ml, etc.), molaridad, molalidad, fracción molar u otras descripciones similares de concentración. La máxima cantidad de equilibrio de soluto que puede disolver por cantidad de disolvente es la solubilidad de ese soluto en ese disolvente en las condiciones especificadas, incluyendo la temperatura, la presión, el pH, y la naturaleza del disolvente. En determinadas realizaciones, la solubilidad se mide a un pH fisiológico u otro pH, por ejemplo, a un pH de 5.0, pH de 6.0, pH de 7.0 o pH de 7.4. En determinadas realizaciones, la solubilidad se mide en agua o un tampón fisiológico como PBS o NaCl (con o sin NaP). En realizaciones específicas, la solubilidad se mide a un pH relativamente más bajo (*por ejemplo*, un pH de 6.0) y sal relativamente más alta (*por ejemplo*, 500 mM NaCl y 10mM NaP). En determinadas realizaciones, la solubilidad se mide en un líquido biológico (disolvente) como sangre o suero. En determinadas realizaciones, la temperatura puede ser aproximadamente la temperatura ambiente (*por ejemplo*, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25 °C) o aproximadamente la temperatura corporal (~37°C). En determinadas realizaciones, una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o un conjugado p97 tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19, 20, 25, o 30 mg/ml a temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C.

Un «**sujeto**», en el presente documento, incluye cualquier animal que muestra un síntoma, o está en riesgo de mostrar un síntoma, que se puede tratar o diagnosticar con una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o un conjugado p97 de la invención. Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (como ratones, ratas, conejos o conejillos de Indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (como gatos o perros). También están incluidos los primates no humanos y, preferiblemente, los pacientes humanos. En realizaciones específicas, el sujeto tiene un trastorno de depósito lisosómico, como el síndrome de Hunter.

«**Sustancialmente**» o «**básicamente**» significa casi totalmente o completamente, por ejemplo, aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior de una cantidad dada. En algunos aspectos, una proteína de la enfermedad de depósito lisosómico está sustancialmente desfosforilada, por ejemplo, en relación con una proteína de tipo salvaje correspondiente producida en células mamíferas (por ejemplo, células humanas).

«**Sustancialmente libre**» se refiere a la ausencia total o casi total de una cantidad determinada, por ejemplo, inferior a aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o inferior a una cantidad determinada. Por ejemplo, ciertas composiciones pueden estar «sustancialmente libres» de proteínas celulares, membranas, ácidos nucleicos, endotoxinas u otros contaminantes. En algunos aspectos, una proteína del trastorno por depósito lisosómico está "sustancialmente libre" de grupos de fosfato.

El término «**tratamiento**» o «**tratar**» incluye cualquier efecto deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o condición, y puede incluir incluso mejoras o cambios mínimos en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o condición que se está tratando. Los términos «tratamiento» o «tratar» no indican necesariamente la erradicación completa o la curación de la enfermedad o condición, o los síntomas asociados a la misma. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto que lo necesite. Los ejemplos de marcadores de mejora clínica serán evidentes para el experto en la técnica.

El término «**tipo salvaje**» se refiere a un gen o un producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente que se produce de forma natural. Un gen o producto génico de tipo salvaje (*por ejemplo*, un polipéptido) es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por tanto, se designa arbitrariamente como la forma «normal» o «tipo salvaje» del gen.

Proteínas del trastorno de depósito lisosómico sustancialmente desfosforiladas

Como se ha señalado anteriormente, las realizaciones de la presente invención incluyen proteínas del trastorno de depósito lisosómico (LSD) sustancialmente desfosforiladas que se asocian con una o más enfermedades relacionadas con el depósito lisosómico. Los ejemplos incluyen hidrolasas lisosómicas y otras enzimas lisosómicas que metabolizan los materiales de desecho y los residuos celulares como lípidos, glicoproteínas y mucopolisacáridos, proteínas transmembrana, proteínas no enzimáticas solubles, proteínas transportadoras de membrana y proteínas que post-translacionalmente modifican las enzimas.

Los ejemplos de proteínas de LSD o lisosómicas incluyen iduronato-2-sulfatasa, L-iduronidasa, aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, Lamp-2, α -galactosidasa A, ceramidasa ácida, α -L-fucosidasa, β -hexosaminidasa A, activador de GM2-gangliósido (GM2A), α -D- manosidasa, β -D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposin B, neuraminidasa, α -N-acetilglucosaminidasa fosfotransferasa, fosfotransferasa subunidad y, heparán-N-sulfatasa, α - N-acetilglucosaminidasa, acetilCoA:N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa 6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, sulfatasas, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, catepsia A, catepsia K, α -galactosidasa B, NPC1, NPC2, sialina, y transportador de ácido siálico. En realizaciones específicas, la proteína de LSD es una proteína humana.

En determinadas realizaciones, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada es al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% (*es decir*, completamente) desfosforilada, en relación a una proteína de LSD de control correspondiente.

En algunas realizaciones, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada está sustancialmente libre de grupos fosfato, por ejemplo, la proteína de LSD tiene aproximadamente menos de un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o 50% de los grupos fosfato de una proteína de LSD de control correspondiente. Las alteraciones en la fosforilación de la proteína se pueden medir según las técnicas habituales de la técnica, como el análisis SDS-PAGE para medir el peso molecular total, el etiquetado de isótopos y la espectrometría de masas (véase Bonenfant et al., *PNAS EE.UU.* 100:880-885, 2003); Western blot y ELISA utilizando anticuerpos específicos de fosfoproteína; y análisis cuantitativo del estado de fosforilación de la proteína utilizando colorantes detectores de fosforilación fluorescente (véase el colorante Pro-Q Diamond® de Molecular Probes).

Una proteína de «control» correspondiente incluye una proteína del mismo tipo (*por ejemplo*, el mismo nombre de proteína del mismo género y/o especie, la misma o casi idéntica secuencia de aminoácidos), que se ha producido recombinantemente en una célula de mamífero (*por ejemplo*, una célula humana) con equipos de glicosilación y fosforilación normal o de tipo salvaje (*por ejemplo*, células CHO, células HEK), y que preferiblemente no ha sido tratada, por ejemplo, con una enzima como una glucosidasa o una fosfatasa. En algunos aspectos, la proteína de control correspondiente es una versión tipo salvaje de la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada. En realizaciones específicas, por ejemplo, donde la proteína de LSD es iduronato-2-sulfatasa, la proteína de control correspondiente es idursulfasa (Elaprased®) producida en una célula humana, como la línea celular de fibrosarcoma humano HT-1080 (véase Garcia et al., *Mol. Genet. Metab.* 91: 183-90, 2007; y la Figura 5).

Las proteínas de LSD desfosforiladas se pueden preparar según diversas técnicas de la técnica. Por ejemplo, ya que muchos grupos fosfatos están asociados a residuos de manosa-6-fosfato en N-glicanos de oligomanosa, reducir el número de glicanos o el grado de glicosilación en una proteína de LSD puede reducir asimismo el número de grupos fosfatos o el grado de fosforilación. Por tanto, se pueden conseguir niveles reducidos de fosforilación asociada a glicanos, por ejemplo, mutando uno o más residuos asociados a puntos de glicosilación potenciales (*por ejemplo*, residuos en puntos de N-glicosilación como Asn-X-Ser o Asn-X-Thr donde X es cualquier aminoácido excepto Pro), por deglicosilación enzimática (*por ejemplo*, tratamiento con Péptido-N-Glucosidasa F (PNGase F), manosidasa), mediante manipulación de un medio de cultivo celular o condiciones de cultivo celular para inhibir el procesamiento de N-glicano, y/o por la producción recombinante de proteínas de LSD en células de mamíferos, levaduras, insectos u otros tipos que tengan funciones alteradas, reducidas o no glicosiladas (véase, *por ejemplo*, Hossler et al., *Glycobiology.* 19:936-949, 2009; y Cummings y Esko et al., editors, *Essentials of Glycobiology.* 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, incluyendo capítulos 8, 46 y 50). Entre los ejemplos de células que tienen funciones de glicosilación significativamente reducidas se incluyen muchas bacterias, como *E. coli*.

En determinados casos, sin embargo, es preferible reducir la fosforilación de una proteína de LSD sin reducir significativamente su estado de glicosilación, es decir, sin reducir significativamente el número o cantidad de glicanos, incluyendo N-glicanos de oligomanosa. Por tanto, en determinadas realizaciones, una proteína de LSD está sustancialmente desfosforilada en relación a una proteína de control correspondiente, pero tiene el mismo o sustancialmente el mismo número de glicanos o grado de glicosilación en la proteína de control. En realizaciones específicas, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada tiene el mismo número o sustancialmente el mismo número o grado de N-glicanos de oligomanosa que la proteína de control correspondiente. Los ejemplos incluyen aquellos en los que la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada tiene al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100% del número de glicanos (*por ejemplo*, N-glicanos de oligomanosa) o grado de glicosilación dada la proteína de control. Los estados de glicosilación se pueden medir según una variedad de técnicas conocidas en la técnica, como el análisis SDS-PAGE para medir el peso molecular total, métodos basados en gel 2-D fluorescente combinados con el tratamiento previo enzimático de proteínas con PNGase F (Péptido: N- Glucosidasa F) y Western blot de gel 2-D fluorescente o gel 2-D (véase Graham et al., *Proteomics.* 8:4919-30, 2008), y métodos basados en espectrometría de masas para cuantificar las N-glicoproteínas (véase Rebecchi et al., *Current Proteomics.* 8:269-277(9), 2011).

En estas y en realizaciones relacionadas, los glicanos en particular: (*por ejemplo*, N-glicanos de oligomanosa; véase la Figura 4) pueden estar sustancialmente desfosforilados en relación a los glicanos de una proteína de control correspondiente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los glicanos (*por ejemplo*, los N-glicanos de oligomanosa) de la proteína de LSD están al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100% (es decir, completamente) desfosforilados, en relación a los glicanos de una proteína de LSD de control correspondiente. En algunos aspectos, los glicanos (*por ejemplo*, los N-glicanos de oligomanosa) de la proteína de LSD están sustancialmente libres de grupos fosfatos, por ejemplo, al tener menos de aproximadamente un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o 50% de los grupos fosfatos de los glicanos de una proteína de LSD de control correspondiente. En determinadas realizaciones, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada está sustancialmente libre de residuos de manosa-6-fosfato (M6P) que, por ejemplo, tienen menos de aproximadamente un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o un 50% de los residuos M6P de una proteína de LSD de control correspondiente.

En algunas realizaciones, se puede producir una proteína de LSD glucosilada y fosforilada en células mamíferas y en otras células y, a continuación, ser tratada *in vitro* con uno o más fosfatasas para reducir el número de grupos fosfatos (*por ejemplo*, residuos de manosa-6-fosfato asociados a N-glicanos de oligomanosa), opcionalmente sin reducir significativamente el número de glicanos o el grado de glicosilación (véase el Ejemplo 1). Los ejemplos

generales de fosfatasa incluyen fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina. Los ejemplos de fosfatasa ácida incluyen fosfatasa ácida prostática, fosfatasa ácida lisosómica, fosfatasa ácida eritrocítica, fosfatasa ácida macrófaga, fosfatos ácidos osteoclasticos, y fosfatasa ácida de la patata. Entre los ejemplos de fosfatasa alcalina que se utilizan habitualmente se incluyen las fosfatasa alcalina de gamba, fosfatasa alcalina intestinal de ternero, fosfatasa alcalina de placenta y fosfatasa alcalina segregada (*es decir*, un truncamiento C-terminal de fosfatasa alcalina de placenta).

En algunos aspectos, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada es iduronidasa humana (α -L- iduronidasa; IDU), o un fragmento activo o variante de la misma. La iduronidasa es una enzima lisosómica implicada en la degeneración de glucosaminoglucanos como dermatán sulfato y heparán sulfato, y su deficiencia está asociada al MPS I, o síndrome de Hurler. ID SEC N° 3 proporciona la secuencia de aminoácido primaria de iduronidasa humana.

La IDU humana tiene seis puntos de N-glicosilación potenciales, principalmente oligosacáridos de «tipo complejo», al menos dos de los cuales se ha demostrado que son manosa-6-fosforilada (*véase* Brooks et al., *Glycobiology*. 11:741-750, 2001; y Zhao et al., *Biol. Chem.* 272:22758-22765:1997). En algunas realizaciones, una IDU humana sustancialmente desfosforilada tiene mutaciones en uno o más de estos puntos de glicosilación, para reducir los N-glicanos y sus residuos de manosa-6- fosfato asociados. Por tanto, en estas realizaciones y en otras relacionadas, una proteína IDU humana está sustancialmente desglucosilada (*por ejemplo*, de N-glicanos de oligomanosa) y sustancialmente desfosforilada, en relación con una proteína IDU humana tipo salvaje.

En aspectos específicos, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada es iduronato-2- sulfatasa (IDS) humana, o un fragmento activo o variante del mismo. La IDS (iduronato-2-sulfatasa; EC 3.1.6.13) es una exo-sulfatasa lisosómica que está implicada en la degradación de los glucosaminoglucanos de heparán sulfato y dermatán sulfato. Una deficiencia de IDS produce el trastorno de depósito lisosómico MPS II (mucopolisacaridosis tipo II). ID SEC N°2 proporciona la secuencia de aminoácidos primaria de IDS humana (idursulfasa). También se incluyen variantes de glicosilación de IDS humana (*véanse* Patente USA N° 5.798.239 y 5.932.211), que han sido sustancialmente desfosforiladas, como se describe en este documento.

La secuencia de IDS humana contiene ocho puntos de N-glicosilación potenciales (*es decir*, motivos NXS/T) en las posiciones 31, 115, 144, 246, 280, 325, 513 y 537 (*véase* Parkinson-Lawrence et al., *Biochem J.* 386:395-400, 2005; y la Figura 6 para los puntos de N-glicosilación en la ID SEC N° 2). En algunas realizaciones, una IDS humana sustancialmente desfosforilada tiene mutaciones en uno o más de estos puntos de glicosilación, para reducir los N-glicanos y sus residuos de manosa-6- fosfato asociados. Por tanto, en estas realizaciones y en otras relacionadas, una proteína IDS humana está sustancialmente desglucosilada (*por ejemplo*, de N-glicanos de oligomanosa) y sustancialmente desfosforilada, en relación con una proteína IDS humana tipo salvaje.

En otros aspectos, una proteína IDU o IDS humana sustancialmente desfosforilada tiene el mismo número o sustancialmente el mismo número de glicanos o un grado de glicosilación que una proteína IDS o IDU humana de control correspondiente (*por ejemplo*, una proteína tipo salvaje). Por ejemplo, la proteína IDU o IDS humana sustancialmente desfosforilada puede tener N-glicanos (*por ejemplo*, glicanos de oligomanosa) a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los puntos de N-glicosilación potenciales. Por tanto, la proteína IDU o IDS humana tiene al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100% del número o cantidad de N-glicanos de oligomanosa que una IDU o IDS humana tipo salvaje correspondiente producido (expresado) en una célula de mamífero, opcionalmente una célula humana. En aspectos específicos, uno o más N-glicanos de oligomanosa de IDU o IDS humana están sustancialmente desfosforilados, con respecto a los N-glicanos de oligomanosa de la proteína IDU o IDS humana de control correspondiente. Por ejemplo, uno o más N-glicanos de oligomanosa de IDU o IDS humana pueden estar al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o un 100% (*es decir*, completamente) desfosforilados, en relación a una proteína IDS humana de control correspondiente. En algunos aspectos, uno o más de los N-glicanos de oligomanosa de IDU o IDS humana están sustancialmente libres de grupos fosfatos, por ejemplo, los glicanos de la proteína IDU o IDS desfosforilada tienen menos de aproximadamente un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de los grupos fosfatos de los glicanos de una proteína IDU o IDS humana de control correspondiente. En determinadas realizaciones, la proteína IDU o IDS sustancialmente desfosforilada está sustancialmente libre de residuos de manosa-6-fosfato (M6P), por ejemplo, al tener menos de aproximadamente un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de residuos M6P de una proteína IDU o IDS de control correspondiente. En realizaciones específicas, la proteína IDS sustancialmente desfosforilada tiene un contenido M6P de aprox. o menos de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, o 1,5 pmol de proteína IDS M6P/mol, incluyendo todos los rangos y números enteros intermedios.

En realizaciones específicas, la proteína IDS humana es una forma sustancialmente desfosforilada de idursulfasa (Elaprased®), producida en una célula humana (por ejemplo, célula HT-1080), que ha sido tratada con una o más fosfatasa (*por ejemplo*, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina) para reducir el número de grupos fosfatos o residuos M6P de la misma.

Secuencias de polipéptidos p97 y conjugados

Las realizaciones de la presente invención también incluyen conjugados compuestos por un polipéptido p97 humano (melanotransferrina; MTf) que está acoplado, conectado o unido a una proteína de LSD desfosforilada aquí descrita, composiciones compuestas por dichos conjugados y métodos de uso relacionados.

- En realizaciones específicas, el polipéptido p97 está covalentemente, no covalentemente, u operativamente acoplado a la proteína de LSD desfosforilada para formar un agente conjugado p97. En algunos aspectos, el conjugado p97 se puede acoplar además a uno o más agentes de interés adicionales, como una molécula pequeña y/o una entidad detectable. A continuación, se describen algunos ejemplos de agentes y secuencias del polipéptido p97. También se describen componentes y métodos de ejemplo, como grupos de enlace, para acoplar un polipéptido p97 a una proteína de LSD desfosforilada u otro agente de interés.
- Secuencias p97. En determinadas realizaciones, una secuencia polipéptida p97 utilizada en una composición y/o conjugado de la invención comprende, se compone esencialmente de, o se compone de la secuencia de p97 humana que se establece en ID SEC N°:1. También se incluyen variantes y fragmentos de la misma.
- En algunas realizaciones, una secuencia polipéptida p97 comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o un 99% de identidad u homología, a lo largo de su longitud, con respecto a la secuencia de p97 humana establecida en ID SEC N°:1, o una parte de la misma.
- En realizaciones específicas, una secuencia p97 polipéptida comprende un fragmento de una secuencia de p97 humana establecida en ID SEC N°:1. En determinadas realizaciones, un fragmento de polipéptido p97 es aproximadamente, al menos aproximadamente, o hasta aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 700, 710, 720, 730 o más aminoácidos en longitud, incluyendo todos los números enteros y rangos intermedios, y que pueden comprender todo o una parte de la secuencia de una secuencia p97 de referencia como ID SEC N°:1.
- En determinadas realizaciones, un fragmento de polipéptido p97 es aproximadamente 5-700, 5-600, 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 5-40, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-700, 10-600, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 20-700, 20-600, 20-500, 20-400, 20-300, 20-200, 20-100, 20-50, 20-40, 20-30, 20-25, 30-700, 30-600, 30-500, 30-400, 30-300, 30-200, 30-100, 30-50, 30-40, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200, 40-100, 40-50, 50-700, 50-600, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100, 60-700, 60-600, 60-500, 60-400, 60-300, 60-200, 60-100, 60-70, 70-700, 70-600, 70-500, 70-400, 70-300, 70-200, 70-100, 70-80, 80-700, 80-600, 80-500, 80-400, 80-300, 80-200, 80-100, 80-90, 90-700, 90-600, 90-500, 90-400, 90-300, 90-200, 90-100, 100-700, 100-600, 100-500, 100-400, 100-300, 100-250, 100-200, 100-150, 200-700, 200-600, 200-500, 200-400, 200-300, o 200-250 aminoácidos en longitud, y comprende todo o una parte de una secuencia p97 de referencia como, por ejemplo, ID SEC N°:1.
- En determinadas realizaciones, las secuencias polipéptidas p97 de interés incluyen secuencias de aminoácidos p97, subsecuencias, y/o variantes de p97 que son efectivas para transportar un agente de interés a través de la barrera hematoencefálica y hasta el sistema nervioso central (SNC). En realizaciones específicas, la variante o fragmento comprende el N-lóbulo de p97 humano (residuos 20-361 de ID SEC N°:1). En aspectos específicos, la variante o fragmento comprende un punto de unión Fe^{3+} - intacto y funcional.
- En algunas realizaciones, una secuencia polipéptida p97 es una forma soluble de un polipéptido p97 (véase Yang *et al.*, *Prot Exp Purif.* 34:28-48, 2004), o un fragmento o variante del mismo. En algunos aspectos, el polipéptido p97 soluble tiene una supresión de todo o una parte del dominio hidrofóbico (residuos 710-738 de ID SEC N°:1), solo o en combinación con una supresión de todo o una parte del péptido señal (residuos 1-19 de ID SEC N°:1). En aspectos específicos, el polipéptido p97 soluble comprende o se compone de residuos 20-711 de ID SEC N°:1, incluyendo variantes y fragmentos del mismo.
- En determinadas realizaciones, por ejemplo, aquellas que utilizan liposomas, la secuencia polipéptida p97 es una forma lipídica soluble de un polipéptido p97. Por ejemplo, determinadas de estas realizaciones y otras relacionadas incluyen un polipéptido p97 que comprende todo o una parte del dominio hidrofóbico, opcionalmente con o sin el péptido señal.
- En otras realizaciones determinadas, el fragmento p97 o variante puede unirse específicamente a un receptor p97, un receptor LRP1 y/o un receptor LRP1B.
- A continuación, se describen más detalladamente variantes y fragmentos de polipéptidos p97 de referencia y otros polipéptidos de referencia.
- Conjugados p97. Como se ha indicado anteriormente, determinadas realizaciones comprenden un polipéptido p97 que está conectado a una proteína de LSD desfosforilada u otro agente de interés, por ejemplo, una molécula pequeña o una entidad detectable, o cualquier combinación de la misma. También se incluyen conjugados compuestos por más de una proteína de LSD desfosforilada y agente de interés, por ejemplo, un fragmento p97 conjugado para una o más proteínas de LSD desfosforiladas y una molécula pequeña.

Se prefieren enlaces covalentes aunque también se pueden utilizar enlaces no covalentes, incluyendo aquellos que utilizan interacciones proteína-ligando no covalentes relativamente fuertes, como la interacción entre biotina y avidina. También se incluyen enlaces operativos, que no requieren necesariamente una interacción directamente covalente o no covalente entre el polipéptido p97 y la proteína de LSD desfosforilada o el agente de interés; ejemplos de estos enlaces incluyen mezclas de liposomas que comprenden un polipéptido p97 y una proteína de LSD desfosforilada y opcionalmente un agente adicional de interés. En este documento se describen los métodos ilustrativos de generación de conjugados de proteínas, y otros métodos bien conocidos en la técnica.

Moléculas pequeñas. En realizaciones específicas, el conjugado p97 está unido o conectado adicionalmente a una molécula pequeña. Una «molécula pequeña» se refiere a un compuesto orgánico que tiene un origen sintético o biológico (biomolécula), pero que de forma típica no es un polímero. Los compuestos orgánicos hacen referencia a una amplia clase de compuestos químicos cuyas moléculas contienen carbono, de forma típica, se excluyen aquellos que solo contienen carbonatos, óxidos de carbono simples, o cianuros. El término «biomolécula» se refiere generalmente a una molécula orgánica que es producida por un organismo vivo, incluyendo grandes moléculas poliméricas (biopolímeros) como péptidos, polisacáridos y también ácidos nucleicos, y moléculas pequeñas como metabolitos principales y secundarios, lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides, glicerolípidos, vitaminas y hormonas. El término «polímero» se refiere generalmente a una molécula grande o macromolécula compuesta de unidades estructurales que se repiten, que están conectadas de forma típica por una unión química covalente.

En determinadas realizaciones, una molécula pequeña tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 1000-2000 Daltons, de forma típica entre aproximadamente 300 y 700 Daltons, e incluyendo aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o 2000 Daltons.

Para el tratamiento de trastornos por depósito lisosómico, los ejemplos de clases de moléculas pequeñas incluyen las que se utilizan para terapia de reducción de sustratos y terapia de chaperonas farmacológicas, supresores de mutación sin sentido prematuros y reguladores de proteostasis (véase Smid et al., *Expert Opin. Investig. Drugs*. 19:1367-79, 2010; y Beck, *IUBMB Life*. 62:33-40, 2010).

En algunos aspectos, la molécula pequeña es una molécula antiinflamatoria. Los ejemplos incluyen esteroides y glucocorticoides (*por ejemplo*, budesonida, dexametasona, betametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS), como aspirina, ibuprofeno, naproxeno metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato, entre otros.

Entidades detectables. En algunas realizaciones, el conjugado p97 está unido o conectado adicionalmente a una «entidad detectable». Ejemplos de entidades detectables incluyen, sin limitación, etiquetas basadas en yodo, radioisótopos, colorantes fluoróforos/fluorescentes y nanopartículas.

Los ejemplos de etiquetas basadas en yodo incluyen ácido diatrizoico (Hypaque®, GE Healthcare) y su forma aniónica, diatrizoato. El ácido diatrizoico es un agente de radio-contraste que se utiliza en técnicas de rayos X avanzadas, como la tomografía computerizada. También se incluyen los radioisótopos de yodo, que se describen a continuación.

Los ejemplos de radioisótopos que se pueden utilizar como entidades detectables incluyen ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H , ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{111}In , ^{169}Yb , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{55}Fe , e isótopos de yodo como ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , y ^{131}I . Estos radioisótopos tienen distintas vidas medias, tipos de desintegración, y niveles de energía que se pueden adaptar a las necesidades de un protocolo determinado. Algunos de estos radioisótopos se pueden dirigir selectivamente o dirigir mejor a los tejidos del SNC mediante conjugación a polipéptidos p97, por ejemplo, para mejorar las imágenes médicas de dichos tejidos.

Ejemplos de fluoróforos o fluorocromos que puede utilizarse como entidades detectables directamente incluyen fluoresceína, tetrametilrodamina, Oregon Red, Oregon Green®, y otros *por ejemplo*, Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes - 9ª ed.*, 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene, Oregon; Haugland, *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-10ª ed.*, 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA). También se incluyen colorantes emisores de luz o colorantes detectables. La luz emitida por los colorantes puede ser visible o invisible, como luz ultravioleta o luz infrarroja. En las realizaciones que se muestran como ejemplo, el colorante puede ser un colorante de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); un colorante de xanteno, como fluoresceína y rodamina; un colorante con un grupo amino en la posición alfa o beta (como un colorante de sulfonato naftilamina, 1-dimetilaminonaftil-5, sulfonato 1-anilino-8-naftaleno y sulfonato 2-p-toluidina-6-naftaleno); un colorante que tiene 3-fenil-7-isocianatocumarina; una acridina, como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; un pireno, un benzoxadiazol y un estilbeno; un colorante que tiene 3-(ϵ -carboxipentil)-3-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CYA); 6-carboxi fluoresceína (FAM); 5&6-carboxirodamina-110 (R110); 6-carboxirodamina-6G (R6G); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; Rojo de Tejas y rojo de rodamina; 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); 5-carboxi-2',4,5,7'-tetraclorofluoresceína (ZOE); NAN; NED; Ci3; Ci3,5; Ci5; Ci5,5; Ci7; y Ci7,5; IR800CW, ICG, Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 680, o Alexa Fluor 750. Determinadas realizaciones incluyen la conjugación para agentes quimioterapéuticos (*por ejemplo*, paclitaxel adriamicina) que son etiquetados con una entidad detectable, como un fluoróforo *por ejemplo*, Oregon Green®, Alexa Fluor 488).

Las nanopartículas generalmente oscilan entre aproximadamente 1 a 1000 nm de tamaño e incluyen diversas estructuras químicas como partículas de oro y plata y puntos cuánticos. Cuando se irradian con luz blanca incidente en ángulo, las nanopartículas de oro o de plata que oscilan entre 40 y 120 nm dispersarán la luz monocromática con alta intensidad. La longitud de onda de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula. Cuatro-cinco partículas diferentes en estrecha proximidad dispersarán cada una de ellas luz monocromática, que cuando se superponga dará un color único, específico. Las nanopartículas derivadas como partículas de plata o de oro pueden conectarse a una amplia serie de moléculas incluyendo proteínas, anticuerpos, moléculas pequeñas, ligandos de receptor y ácidos nucleicos. Ejemplos específicos de nanopartículas incluyen nanopartículas metálicas y nanoesferas metálicas como partículas de oro, partículas de plata, partículas de cobre, partículas de platino, partículas de cadmio, partículas compuestas, esferas huecas de oro, nanoesferas de sílice recubiertas de oro, y esferas de oro recubiertas de sílice. También se incluyen sílice, látex, poliestireno, policarbonato, poliacrilato, nanopartículas PVDF y partículas de color de cualquiera de estos materiales.

Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes alrededor de aproximadamente 1-5 nm de diámetro que se pueden estimular por luz a través de una amplia gama de longitudes de onda. Tras la estimulación por la luz con una longitud de onda apropiada, estos cristales emiten luz, como luz monocromática, con una longitud de onda que depende de su composición química y tamaño. Los puntos cuánticos como CdSe, ZnSe, InP, o InAs poseen propiedades ópticas únicas; estos y puntos cuánticos similares están disponibles a través de diversas fuentes comerciales (*por ejemplo*, NN-Labs, Fayetteville, AR; Ocean Nanotech, Fayetteville, AR; Nanoco Technologies, Manchester, Reino Unido; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Variantes y fragmentos de polipéptidos. Determinadas realizaciones incluyen variantes y/o fragmentos de los polipéptidos de referencia descritos aquí, o bien se describen por nombre o referencia en un identificador de secuencias, incluyendo polipéptidos p97 y proteínas de LSD. El tipo salvaje o las secuencias más prevalentes de estos polipéptidos son conocidos en la técnica, y se pueden utilizar como una comparación de las variantes y fragmentos que aquí se describen.

Una «variante» de polipéptido, según se utiliza aquí este término, es un polipéptido que de forma típica difiere de un polipéptido específicamente descrito aquí por una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones. Los polipéptidos variantes son biológicamente activos, es decir, que continúan teniendo actividad enzimática o de enlace de un polipéptido de referencia. Dichas variantes pueden ser el resultado, por ejemplo, del polimorfismo genético y/o de manipulación humana.

En muchos casos, una variante biológicamente activa contendrá una o más sustituciones conservadoras. Una «sustitución conservadora» es aquella en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido estuvieran sustancialmente inalteradas. Como se ha descrito anteriormente, se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y aún así obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desee alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un equivalente, o incluso una mejora, variante o porción de un polipéptido de la invención, un experto normalmente cambiará uno o más de los codones de la secuencia de ADN de codificación según la tabla A siguiente.

			Tabla A							
Aminoácidos							Codones			
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU				
Cisteína	Cis	C	UGC	UGU						
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU						
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG						
Fenilalanina	Fe	F	UUC	UUU						
Glicina	Gli	G	GGA	GGC	GGG	GGU				
Histidina	His	H	CAC	CAU						
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU					
Lisina	Lis	K	AAA	AAG						
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU		
Metionina	Met	M	AUG							
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU						
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG						

Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Tr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tir	Y	UAC	UAU				

Por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras como, por ejemplo, regiones de unión de antígenos de anticuerpos o puntos de unión en moléculas de sustratos. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína la que define esa actividad funcional biológica de la proteína, se pueden hacer determinadas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia de proteínas, y, por supuesto, su secuencia de codificación del ADN subyacente y, sin embargo, obtener una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla la posibilidad de que se puedan realizar varios cambios en las secuencias péptidas de las composiciones descritas, o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad.

Al hacer esos cambios, se puede tener en cuenta el índice hidropático de aminoácidos. La importancia del índice aminoácido hidropático en conferir la función biológica interactiva de una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982, incorporada aquí por referencia). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

Cada aminoácido tiene asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga (Kyte & Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Es conocido en la técnica que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tengan una puntuación o un índice hidropático similar y que aún así resulten en una proteína con actividad biológica similar, *es decir*, siguen obteniendo una proteína equivalente funcionalmente biológica. Al hacer dichos cambios, es preferible la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , aquellos que están dentro de ± 1 son especialmente preferidos y aquellos que están dentro de $\pm 0,5$ son incluso más especialmente preferidos.

Se entiende también en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer efectivamente en base a la hidrofiliidad. La Patente USA 4.554.101, afirma que el mayor promedio local de hidrofiliidad de una proteína, que se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la Patente U. S. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y aun así obtener una proteína equivalente desde el punto de vista biológico y, en especial, inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, es preferible la sustitución de aminoácidos cuyos índices de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , aquellos que están dentro de ± 1 son especialmente preferidos y aquellos que están dentro de $\pm 0,5$ son incluso más especialmente preferidos.

Como se ha señalado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos, por tanto, se basan generalmente en la relativa similitud de sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones de ejemplo que toman varias de las características anteriores son bien conocidas por el experto en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse sobre la base de la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina, glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen: (1) ala, pro, gli, glu, asp, gin, asn, ser, tr; (2) cis, ser, tir, tr; (3) val, ile, leu, met, ala, fe; (4) lis, arg, his; y (5) fe, tir, trp, his.

Una variante puede contener también, o de forma alternativa, cambios no conservadores. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, supresión o adición inferior a aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 aminoácidos, o incluso 1 aminoácido. Las variantes también pueden ser modificadas (o alternativamente), por ejemplo, por supresión o adición de aminoácidos que tengan una influencia

mínima sobre la inmunogenicidad, la estructura secundaria, la actividad enzimática y/o naturaleza hidropática del polipéptido.

En determinadas realizaciones, una secuencia polipéptida se compone aproximadamente, al menos aproximadamente o hasta aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 o más aminoácidos contiguos en longitud, incluyendo todos los números enteros intermedios, y que pueden comprender la totalidad o una parte de una secuencia de referencia (*véase, por ejemplo*, el listado de la secuencia).

En otras realizaciones específicas, una secuencia polipéptida se compone de aproximadamente o no más de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 o más aminoácidos contiguos, incluyendo todos los números enteros intermedios, y que puede comprender la totalidad o una parte de una secuencia de referencia (*véase, por ejemplo*, el listado de la secuencia).

Aún en otras realizaciones específicas, una secuencia polipéptida se compone de aproximadamente 10-1000, 10-900, 10-800, 10-700, 10-600, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 20-1000, 20-900, 20-800, 20-700, 20-600, 20-500, 20-400, 20-300, 20-200, 20-100, 20-50, 20-40, 20-30, 50-1000, 50-900, 50-800, 50-700, 50-600, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100, 100-1000, 100-900, 100-800, 100-700, 100-600, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200, 200-1000, 200-900, 200-800, 200-700, 200-600, 200-500, 200-400 o 200-300 aminoácidos contiguos, incluyendo todos los rangos intermedios, y comprende todo o una parte de una secuencia de referencia. En algunas realizaciones, la región C-terminal o N-terminal de cualquier polipéptido de referencia se puede trunca por aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 u 800 o más aminoácidos, o por aproximadamente 10- 50, 20-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500- 550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800 o más aminoácidos, incluyendo todos los números enteros y rangos intermedios (*por ejemplo*, 101, 102, 103, 104, 105), siempre que el polipéptido truncado conserve las propiedades aglutinantes y/o actividad del polipéptido de referencia. De forma típica, el fragmento biológicamente activo no tiene menos de aproximadamente un 1%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 25% o aproximadamente un 50% de la actividad del polipéptido de referencia biológicamente activo del que se deriva.

En general, las variantes mostrarán al menos aproximadamente un 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de similitud o identidad de secuencia u homología de secuencia con respecto a una secuencia polipéptida de referencia. Además, se contemplan las secuencias que sean diferentes de las secuencias nativas o parentales por la adición (*por ejemplo*, adición C-terminal, adición N-terminal, ambas), supresión, truncamiento, inserción o sustitución de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos pero que conservan las propiedades o actividades de una secuencia polipéptida de referencia o parental.

En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes difieren de la secuencia de referencia en al menos uno, pero como mínimo en 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 o 2 residuos de aminoácidos. En otras realizaciones, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia de referencia por al menos un 1% pero por lo menos de un 20%, 15%, 10% o 5% de los residuos. (Si esta comparación requiere una alineación, las secuencias se deben alinear para obtener la máxima similitud. Las secuencias «en bucle» de supresiones o inserciones, o desajustes, se consideran diferencias.)

Los cálculos de similitud de secuencia o identidad de secuencia entre secuencias (los términos se utilizan indistintamente en el presente documento) se realizan de la siguiente forma. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (*por ejemplo*, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para obtener una alineación óptima y se pueden ignorar secuencias no homólogas con fines comparativos). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, 60%, e incluso más preferiblemente al menos un 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartido por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que se deben introducir para obtener una alineación óptima de las dos secuencias.

5 La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo Needleman & Wunsch, (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453,1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un *gap weight* de 16, 14, 12,10, 8, 6, o 4 y un *length weight* de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización
10 preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un *gap weight* de 40, 50, 60, 70 u 80 y un *length weight* de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y el que se debe utilizar salvo especificación contraria) son los de una matriz de puntuación Blossum 62 con penalización de espacio de 12, penalización de extensión de espacio de 4, y penalización de espacio de desplazamiento del marco de lectura de 5.

15 La identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Cabios.* 4:11-17,1989) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4.

20 Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos descritos aquí se pueden utilizar como una «secuencia de consulta» para realizar una búsqueda en las bases de datos públicas para identificar, por ejemplo, otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.*, (1990,7. *Mol. Biol.*, 215: 403-10). Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas para las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST
25 se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas para moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineaciones con espacios con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (*NucleicAcids Res.* 25: 3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (*por ejemplo*, XBLAST y NBLAST).

30 En una realización, como se ha indicado anteriormente, se pueden evaluar polinucleótidos y/o polipéptidos utilizando una herramienta de alineación BLAST. Una alineación local se compone simplemente de un par de segmentos de secuencia, uno de cada una de las secuencias que se comparan. Una modificación de algoritmos Smith-Waterman o Sellers encontrará todos los pares de segmentos cuyas puntuaciones no se puedan mejorar por extensión o recorte, denominados pares de segmentos de alta puntuación (HSPs). Los resultados de las alineaciones BLAST incluyen
35 medidas estadísticas para indicar la probabilidad de que la puntuación BLAST pueda esperarse solo por azar.

La puntuación bruta, S , se calcula a partir del número de espacios y sustituciones asociadas con cada secuencia alineada donde las puntuaciones de similitud más altas indican una alineación más significativa. Las puntuaciones de sustitución se dan mediante una tabla de búsqueda (véase PAM, BLOSUM).

40 Las puntuaciones de espacio de forma típica se calculan como la suma de G , la penalización de apertura de espacio y L , la penalización de extensión de espacio. Para un espacio de longitud n , el coste del espacio sería $G+Ln$. La elección de costes de espacio, G y L es empírica, aunque es habitual elegir un valor alto para G (10-15), *por ejemplo*, 11, y un valor bajo para L (1-2) *por ejemplo*, 1.

45 La puntuación de bits, S' , se deriva de la puntuación de alineación bruta en la que se han tenido en cuenta las propiedades estadísticas del sistema de puntuación. Las puntuaciones de bits se normalizan con respecto al sistema de puntuación, por tanto, se pueden utilizar para comparar las puntuaciones de alineación de diferentes búsquedas. Los términos «puntuación de bits» y «puntuación de similitud» se utilizan indistintamente. La puntuación de bits da una indicación de lo óptima que es la alineación; cuanto más alta sea la puntuación, mejor es la alineación.

50 El valor E o valor esperado, describe la probabilidad de que una secuencia con una puntuación similar se producirá en la base de datos por azar. Es una predicción del número de diferentes alineaciones con puntuaciones equivalentes a o mejores que S que se espera que se produzcan en una búsqueda en la base de datos por azar. Cuanto menor sea el valor E , más significativa es la alineación. Por ejemplo, una alineación con un valor E de e^{-117} significa que es muy improbable que se produzca una secuencia con una puntuación similar simplemente por azar. Además, es necesario que la puntuación esperada para alinear un par aleatorio de aminoácidos sea negativa, de lo contrario las alineaciones largas tenderán a tener una puntuación alta independientemente de si los segmentos
55 alineados estaban relacionados. Además, el algoritmo BLAST utiliza una matriz de sustitución, nucleótido o aminoácido apropiados y para las alineaciones con espacios utiliza penalizaciones de extensión y creación de espacios. Por ejemplo, la alineación BLAST y la comparación de secuencias polipéptidas de forma típica se realiza utilizando la matriz BLOSUM62, la penalización de existencia de espacio de 11 y la penalización de extensión de espacio de 1.

60

En una realización, las puntuaciones de similitud de secuencia se notifican a partir del análisis BLAST realizado utilizando la matriz BLOSUM62, la penalización de existencia de espacio de 11 y la penalización de extensión de espacio de 1.

En una realización determinada, las puntuaciones de identidad/similitud de secuencias que se proporcionan en el presente documento hacen referencia al valor obtenido utilizando GAP versión 10 (GCG, Accelrys, San Diego, Calif.) utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud de una secuencia nucleótida utilizando un *GAP Weight* de 50 y un *Length Weight* de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; identidad % y % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando un *GAP Weight* de 8 y un *Length Weight* de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, *PNAS*, *EE.UU.* 89:10915-10919, 1992). GAP utiliza el algoritmo de Needleman & Wunsch (*J Mol Biol.* 48:443-453, 1970) para encontrar la alineación de dos secuencias completas que maximicen el número de coincidencias y minimicen el número de espacios.

En una realización, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que pueden ser alineados óptimamente con una secuencia polipéptida de referencia (véase, por ejemplo, el listado de la secuencia) para generar puntuaciones de bit BLAST o puntuaciones de similitud de secuencia de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, o más, incluyendo todos los números enteros y rangos intermedios, donde la alineación BLAST ha utilizado la matriz BLOSUM62, la penalización de existencia de espacio de 11, y la penalización de extensión de espacio de 1.

Como se ha indicado anteriormente, se puede modificar un polipéptido de referencia de varias maneras, incluyendo sustituciones de aminoácidos, eliminaciones, truncamientos, adiciones e inserciones. Los métodos de estas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de referencia se pueden preparar por mutaciones en el ADN. Los métodos de mutagénesis y alteraciones en la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (*PNAS EE.UU.* 82: 488-492, 1985); Kunkel *et al.*, (*Methods in Enzymol.* 154: 367-382, 1987), Patente USA n°. 4.873.192, Watson, J. D. *et al.*, («Molecular Biology of the Gene», cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias que se citan en la misma. La orientación en cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés se puede encontrar en el modelo de Dayhoff *et al.*, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

Los métodos para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias realizados por tales modificaciones, y para cribar bibliotecas de cDNA para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada son conocidos en la técnica. Dichos métodos son adaptables para el cribado rápido de las bibliotecas génicas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos de referencia. Como ejemplo, se puede utilizar la mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, junto con los ensayos de cribado para identificar variantes polipéptidas (Arkin & Yourvan, *PNAS EE.UU.* 89: 7811-7815, 1992; Delgrave *et al.*, *Protein Engineering.* 6: 327-331, 1993).

Ejemplos de métodos para conjugación. La conjugación o acoplamiento de una secuencia polipéptida p97 a una proteína del trastorno por depósito lisosómico (LSD) u otro agente de interés se puede llevar a cabo utilizando técnicas químicas, bioquímicas y/o moleculares estándar. De hecho, resultará evidente cómo generar un conjugado p97 a la luz de la presente divulgación utilizando metodologías reconocidas en la técnica. Por supuesto, generalmente será preferible al acoplar los componentes principales de un conjugado p97 de la presente invención que las técnicas empleadas y las químicas de enlace resultantes no alteren sustancialmente la funcionalidad deseada o actividad de los componentes individuales del conjugado.

La química de acoplamiento específica empleada dependerá de la estructura del agente biológicamente activo (por ejemplo, pequeñas moléculas, polipéptido), la posible presencia de múltiples grupos funcionales dentro del agente biológicamente activo, la necesidad de pasos de protección/desprotección, la estabilidad química del agente, y similares que el experto en la técnica puede determinar fácilmente. La química de acoplamiento ilustrativa útil para preparar los conjugados p97 de la invención se pueden encontrar, por ejemplo, en Wong (1991), «Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking», CRC Press, Boca Raton, Fla.; y Brinkley «A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Crosslinking Reagents» en *Bioconjug. Chem.*, 3:2013, 1992. Preferentemente, la capacidad de unión y/o actividad del conjugado no se ha reducido sustancialmente como resultado de la técnica de conjugación empleada, por ejemplo, en relación con el agente o polipéptido de LSD no conjugado o el polipéptido p97 no conjugado.

En determinadas realizaciones, una secuencia polipéptida p97 se puede acoplar a un polipéptido de LSD u otro agente de interés directamente o indirectamente. Una reacción directa entre una secuencia de polipéptido p97 y un polipéptido de LSD u otro agente de interés es posible cuando cada uno de ellos posee un sustituyente que puede reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo de salida (por ejemplo, un haluro) en el otro.

- De forma alternativa, puede ser deseable acoplar indirectamente una secuencia polipéptida p97 y un polipéptido de LSD u otro agente de interés a través de un grupo de enlace, que incluya enlaces péptidos y no péptidos. Un grupo de enlace también puede funcionar como un separador para distanciar un agente de interés de la secuencia polipéptida p97 con el fin de evitar interferencias con capacidades de unión, capacidades de focalización u otras funcionalidades. Un grupo de enlace también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente, y aumentar así la eficiencia de acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes o grupos funcionales en agentes, que de otro modo no sería posible. La selección de enlaces estables o liberables también se puede emplear para alterar la farmacocinética de un conjugado p97 y del anticuerpo adjunto u otro agente de interés. Los grupos de enlace ilustrativos incluyen, por ejemplo, grupos de disulfuro, grupos tioéter, grupos de ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos de peptidasa lábiles y grupos de esterasa lábiles. En otras realizaciones ilustrativas, los conjugados incluyen grupos de enlace como los que se describen en la Patente USA 5.208.020 o la Patente EP 0 425 235 BI, y Chari *et al.*, *Cancer Research*. 52: 127-131, 1992. A continuación, se describen ejemplos adicionales de enlaces.
- En algunas realizaciones, puede ser deseable acoplar más de una secuencia polipéptida p97 a un polipéptido de LSD u otro agente, o viceversa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, múltiples secuencias polipéptidas p97 están acopladas a un polipéptido de LSD u otro agente o, de forma alternativa, uno o más polipéptidos p97 están conjugados a múltiples polipéptidos de LSD u otros agentes. Las secuencias polipéptidas p97 pueden ser las mismas o diferentes. Independientemente de la realización específica, los conjugados que contienen múltiples secuencias polipéptidas p97 se pueden preparar de varias maneras. Por ejemplo, se puede acoplar más de un polipéptido directamente a un agente, o se pueden utilizar enlaces que proporcionan múltiples puntos de fijación. Se puede utilizar cualquier variedad de estrategias de reticulación heterobifuncional conocidas para generar los conjugados de la invención. Se entenderá que muchas de estas realizaciones se pueden lograr controlando las estequiometrías de los materiales utilizados durante el procedimiento de conjugación/reticulación.
- En determinadas realizaciones que se utilizan como ejemplo, una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional de succinimidil éster y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amido; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional oxicarbonilimidizaol y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace de carbamato; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional p-nitrofenil carbonato y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace de carbamato; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional triclorofenil carbonato y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace de carbamato; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional tioéster y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino n-terminal forma un enlace amido; Una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional propionaldehído y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario.
- En algunas realizaciones de ejemplo, una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional de butiraldehído y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional acetal y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional piperidona y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional metilcetona y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional tresilato y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional maleimida y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional aldehído y un polipéptido p97 compuesto por un grupo amino forma un enlace amino secundario, una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional hidracina y un polipéptido p97 compuesto por un grupo ácido carboxílico forma un enlace amino secundario.
- En realizaciones específicas de ejemplo, una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional de maleimida y un polipéptido p97 compuesto por un grupo tiol forma un enlace tioéter; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional vinilsulfona y un polipéptido p97 compuesto por un grupo tiol forma un enlace tioéter; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional tiol y un polipéptido p97 compuesto por un grupo tiol forma un enlace disulfuro; una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional ortopiridil disulfuro y un polipéptido p97 compuesto por un grupo tiol forma un enlace disulfuro; y una reacción entre un agente compuesto por un grupo funcional iodoacetamida y un polipéptido p97 compuesto por un grupo tiol forma un enlace tioéter.
- En una realización específica, se utiliza un reticulante amino-a-sulfhidrilo para preparar un conjugado. En una realización preferida, por ejemplo, el reticulante es succinimidilo-4-*N* maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (Thermo Scientific), que es un reticulante sulfhidrilo que contiene NHS-ésteres y grupos reactivos de maleimidias en los extremos opuestos de un brazo separador estabilizado con ciclohexano de longitud media (8,3 ángstroms). SMCC es un reticulante con membrana permeable no divisible que puede utilizarse para crear agentes activados por maleimida, reactivos al sulfhidrilo (*por ejemplo*, polipéptidos, anticuerpos) para su posterior reacción con secuencias polipéptidas p97. Los NHS ésteres reaccionan con aminas primarias a un pH 7-9 para formar uniones de amida estables. Las maleimidias reaccionan con grupos sulfhidrilo a un pH de 6.5-7.5 para formar

uniones de tioéter estables. Así, el éster NHS reactivo a la amina de SMCC se reticula rápidamente con aminas primarias de un agente y el grupo maleimida reactivo al sulfhidrilo resultante está entonces disponible para reaccionar con residuos de cisteína de p97 para producir conjugados específicos de interés.

5 En determinadas realizaciones específicas, la secuencia de polipéptido p97 se modifica para contener grupos sulfhidrilo expuestos para facilitar la reticulación, *por ejemplo*, facilitar la reticulación a un agente activado por maleimida. En una realización más específica, la secuencia polipéptida p97 se modifica con un reactivo que modifica aminas primarias para añadir grupos tiol sulfhidrilo protegidos. En una realización todavía más específica, el reactivo N-succinimidilo-S-acetiltoacetato (SATA) (Thermo Scientific) se utiliza para producir polipéptidos p97 tiolados.

10 En otras realizaciones específicas, un agente activado por maleimida se hace reaccionar en condiciones adecuadas con polipéptidos p97 tiolados para producir un conjugado de la presente invención. Se entenderá que manipulando las ratios de SMCC, SATA, agente y polipéptido p97 en estas reacciones es posible producir conjugados que tienen estequiometrías, pesos moleculares, y propiedades diferentes.

15 En todavía otras realizaciones ilustrativas, los conjugados se generan utilizando agentes de acoplamiento de proteína bifuncional como N-succinimidilo-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidilo-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (como disuccinimidilo suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azida (como bis (p- azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento específicos incluyen N- succinimidilo-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de disulfuro.

25 Las estrategias de reticulación específicas aquí mencionadas son solo algunos de los muchos ejemplos de estrategias de conjugación adecuadas que se pueden utilizar para producir conjugados de la invención. Será evidente para el experto en la técnica que se pueden utilizar una variedad de otros reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homofuncionales como heterofuncionales (como los que se describen en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL), como grupo de enlace. El acoplamiento puede realizarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos de hidratos de carbono oxidados. Hay numerosas referencias que describen dicha metodología, *por ejemplo*, la Patente USA nº 4.671.958 de Rodwell *et al.*

30 Las realizaciones específicas pueden emplear una o más etiquetas de aldehído para facilitar la conjugación entre un polipéptido p97 y un polipéptido de LSD u otro agente (*véanse* las Patentes USA nº 8.097.701 y 7.985.783.). Aquí, la modificación enzimática en un motivo de sulfatasa de la etiqueta del aldehído a través de la acción de una enzima generadora de formilglicina (FGE) genera un residuo de formilglicina (FGly). A continuación, la fracción de aldehído del residuo FGly se puede explotar como un activador químico para la fijación a un punto específico de una fracción de interés en el polipéptido. En algunos aspectos, la fracción de interés es una molécula pequeña, peptido, aptámero, o péptido mimético. En algunos aspectos, la fracción de interés es otro polipéptido, como un anticuerpo.

Las realizaciones específicas, por tanto, incluyen un polipéptido p97 o un polipéptido de LSD u otro agente polipéptido que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 o más motivos de sulfatasa heterólogos, en los que el motivo comprende la estructura siguiente:

$X_1Z_1X_2Z_2X_3$ (ID SEC Nº:4)

40 donde Z_1 es cisteína o serina; Z_2 es un residuo de alanina o prolina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está preferiblemente presente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en un N-terminal del polipéptido marcado aldehído; y X_2 y X_3 son cada uno independientemente cualquier aminoácido.

45 Los polipéptidos con el motivo descrito anteriormente se pueden modificar por una enzima FGE para generar un motivo con un residuo FGly, que, como se ha indicado anteriormente, puede utilizarse entonces para la fijación a un punto específico de un agente, como un segundo polipéptido, por ejemplo, o a través de una fracción de enlace. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo, por ejemplo, expresando el polipéptido que contiene el motivo de sulfatasa (*por ejemplo*, p97, polipéptido de LSD) en una levadura de mamífero, o célula bacteriana que expresa una enzima FGE o por modificación *in vitro* del polipéptido aislado con una enzima FGE aislada (*véase* Wu *et al.*, PNAS. 106:3000- 3005, 2009; Rush & Bertozzi, *J. Am Chem Soc.* 130:12240-1, 2008; y Carlson *et al.*, *J Biol Chem.* 283:20117-25, 2008).

Por tanto, algunas realizaciones incluyen un polipéptido p97 o agente polipéptido (*por ejemplo*, el polipéptido de LSD) que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos de sulfatasa heterólogos que tienen un residuo de formilglicina, donde el motivo comprende la siguiente estructura:

55 $X_1(\text{FGly})X_2Z_2X_3$ (ID SEC Nº:5)

donde FGly es un residuo de formilglicina; Z_2 es un residuo de alanina o prolina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está preferiblemente presente cuando el motivo de sulfatasa heterólogo está en un N-terminal del polipéptido marcado aldehído; y X_2 y X_3 son cada uno independientemente cualquier aminoácido.

En realizaciones particulares, X_1 , X_2 , y X_3 son cada uno independientemente un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar, no cargado. Por ejemplo, X_1 puede ser L, M, V, S o T; y X_2 , y/o X_3 pueden ser independientemente S, T, A, V, G o C.

5 En algunas realizaciones, el o los motivos de sulfatasa heterólogos pueden ser (a) inferiores a 16 residuos aminoácidos en longitud, incluyendo aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 residuos en longitud, (b) situados en el N-terminal del polipéptido, (c) situados en el C-terminal del polipéptido, (d) situados en un punto interno de una secuencia de aminoácidos nativa al polipéptido, (e) situados en un bucle terminal del polipéptido, (f) situados en un punto de modificación post-traslacional del polipéptido (*por ejemplo*, punto de glicosilación), o cualquier combinación de los mismos.

10 Algunas realizaciones están relacionadas con conjugados de (i) un polipéptido p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído), y (ii) un agente (A) como una molécula pequeña que está funcionalizada con un grupo reactivo aldehído, donde (i) y (ii) están unidos covalentemente a través del residuo FGly del motivo de sulfatasa y el grupo reactivo aldehído. Dichos conjugados pueden tener una de las siguientes estructuras generales:

p97(FGly)-R₁A

15 donde R₁ es al menos un enlace reactivo aldehído; y FGly es un residuo de formilglicina dentro de un motivo de sulfatasa heterólogo.

Algunas realizaciones están relacionadas con conjugados de (i) un polipéptido p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído), y (ii) un agente polipéptido (pA) que está funcionalizado con un grupo reactivo aldehído, o viceversa, donde (i) y (ii) están unidos covalentemente a través del residuo FGly del motivo de sulfatasa y el grupo reactivo aldehído. Dichos conjugados pueden tener una de las siguientes estructuras generales:

20 p97(FGly)-R₁-pA o p97-R₁-(FGly)pA

p97(FGly)-R₁-pA o p97-R₁-(FGly)pA

donde R₁ es al menos un enlace reactivo aldehído; y FGly es un residuo de formilglicina dentro de un motivo de sulfatasa heterólogo.

25 El agente o polipéptido que contiene una etiqueta que no es de un aldehído (*por ejemplo*, polipéptido p97, polipéptido de LSD) se puede funcionalizar con uno o más grupos reactivos aldehído como aminooxi, hidracida, y tiosemicarbacida y, a continuación, unirse covalentemente al polipéptido marcado aldehído a través de al menos un residuo FGly, para formar un enlace reactivo aldehído. La fijación de un agente aminooxi funcionalizado (o polipéptido marcado no aldehído) crea un enlace oxima entre el residuo FGly y el agente funcionalizado (o polipéptido marcado no aldehído); La fijación de un agente hidracina funcionalizado (o polipéptido marcado no aldehído) crea un enlace hidracina entre el residuo FGly y el agente funcionalizado (o polipéptido marcado no aldehído); y la fijación de un agente tiosemicarbacida funcionalizado (o polipéptido marcado no aldehído) crea un enlace hidracina carbotiamida entre el residuo FGly y el agente funcionalizado (o polipéptido marcado no aldehído). Por tanto, en estas y otras realizaciones relacionadas, R_i puede ser un enlace que comprende una base Schiff, como un enlace oxima, un enlace hidracina, o un enlace hidracina carbotiamida.

35 Algunas realizaciones incluyen conjugados de (i) un polipéptido p97 que contiene un motivo sulfatasa (o marcado aldehído) y (ii) un agente polipéptido LSD que contiene un motivo sulfatasa (o marcado aldehído) (A), donde (i) e (ii) están unidos covalentemente a través de sus residuos FGly respectivos, opcionalmente a través de un grupo o una fracción de enlace bifuncionalizado. Por ejemplo, determinados conjugados p97 podrían comprender la siguiente estructura:

40 p97(FGly)-R₁L-R₂-(FGly)A

donde R₁ y R₂ son el mismo enlace reactivo aldehído o uno diferente; L es una fracción de enlace, p97(FGly) es un polipéptido p97 marcado aldehído y (FGly)A es un agente marcado aldehído como un agente de polipéptido de LSD.

45 Solo a modo de ilustración, en algunas realizaciones, por lo menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el C-terminal del polipéptido p97 y el N-terminal del agente basado en un polipéptido (*por ejemplo*, un polipéptido de LSD). En otras realizaciones, al menos un motivo de sulfatasa heteróloga puede estar en el N-terminal del polipéptido p97 y el C-terminal del agente basado en polipéptido.

50 En todavía otras realizaciones, al menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el N-terminal del polipéptido p97 y el N-terminal del agente basado en el polipéptido. En otras realizaciones, al menos un motivo de sulfatasa heterólogo puede estar en el C-terminal del polipéptido p97 y el C-terminal del agente basado en un polipéptido. Como se ha indicado anteriormente, al menos un motivo heterólogo puede estar en una posición interna en el polipéptido p97 y/o el agente basado en el polipéptido. El experto en la técnica reconocerá que son posibles otras combinaciones.

55 Los enlaces de reactivo aldehído de R₁ y R₂ se pueden formar independientemente por cualquier grupo reactivo aldehído que formará una unión covalente entre (i) el residuo de formilglicina (FGly) de la etiqueta aldehído y (ii) una fracción de enlace que está funcionalizada con dicho grupo reactivo aldehído (*por ejemplo*, un enlace bifuncionalizado con dos grupos reactivos aldehídos, que pueden ser iguales o diferentes). Ejemplos de grupos reactivos aldehídos incluyen grupos aminooxi, hidracida y tiosemicarbacida, que formarán enlaces que contienen una base Schiff con un residuo FGly, que incluye enlaces de oxima, enlaces de hidracina y enlaces de hidracina

carbotiamida, respectivamente. Por tanto, R_1 y R_2 pueden ser independientemente un enlace que comprende una base Schiff, como un enlace oxima, un enlace hidracina, o un enlace hidracina carbotiamida.

En algunas realizaciones, el polipéptido p97 que contiene la etiqueta aldehído y el polipéptido de LSD que contiene la etiqueta aldehído u otro agente están unidos (*por ejemplo*, unidos covalentemente) a través de un enlace multifuncionalizado (*por ejemplo*, un enlace bi-funcionalizado), este último se funcionaliza con el mismo grupo o grupos reactivos aldehídos o unos diferentes. En estas y otras realizaciones, los grupos reactivos aldehídos permiten que el enlace forme un puente covalente entre el polipéptido p97 y el polipéptido de LSD u otro agente a través de sus respectivos residuos FGly. Las fracciones de enlace incluyen cualquier fracción o producto químico que se pueda funcionalizar y preferiblemente bi- o multi-funcionalizado con uno o más grupos reactivos aldehídos. Ejemplos específicos incluyen péptidos, polímeros solubles en agua, entidades detectables, otros compuestos terapéuticos (*por ejemplo*, compuestos citotóxicos), fracciones de biotina/estreptavidina, y glicanos (*véase* Hudak *et al.*, *J. Am Chem Soc.* 133:16127-35, 2011). Ejemplos específicos de glicanos (o glicósidos) incluyen aminooxi glicanos, como glicanos de un orden superior compuestos de glucosil *N*- pentenoil hidroxamatos intermedios (*supra*). En este documento se muestran como ejemplo algunos enlaces, y se pueden funcionalizar con grupos reactivos aldehídos según las técnicas habituales (*véase, por ejemplo*, Carrico *et al.*, *Nat Chem Biol.* 3:321-322, 2007; y las Patentes U.S. 8.097.701 y 7.985.783).

Los conjugados p97 también se pueden preparar con diversas técnicas de «química clic», entre las que se incluyen reacciones que son modulares, de amplio alcance, producen rendimientos muy elevados, generan subproductos principalmente inofensivos que se pueden eliminar con métodos no cromatográficos, y pueden ser estereoespecíficos aunque no necesariamente enantioselectivos (*véase* Kolb *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.* 40:2004-2021, 2001). Ejemplos particulares incluyen técnicas de conjugación que emplean la cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen de azidas y alquinos, también conocidas como reacciones de «cicloadición azida-alquina» (*véase* Hein *et al.*, *Pharm Res.* 25:2216-2230, 2008). Ejemplos no limitativos de reacciones de cicloadición azida-alquina incluyen reacciones de cicloadición azida-alquina catalizadas por cobre (CuAAC) y reacciones de cicloadición azida-alquina catalizadas por rutenio (RuAAC).

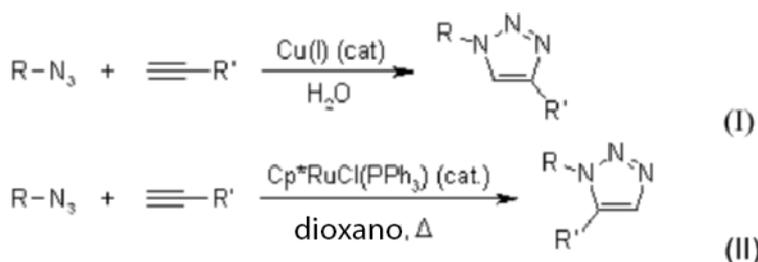
La CuAAC funciona a través de un amplio rango de temperaturas, es insensible a las condiciones acuosas y un rango de pH superior de 4 a 12, y tolera un gran margen de grupos funcionales (*véase* Himo *et al.*, *J Am Chem Soc.* 127:210-216, 2005). El catalizador Cu(I) activo se puede generar, por ejemplo, a partir de sales Cu(I) o sales Cu(II) utilizando ascorbato sódico como agente reductor. Esta reacción forma productos 1,4-sustituidos, lo que hace que sea específica de la región (*véase* Hein *et al.*, *supra*).

RuAAC utiliza complejos de cloruro de rutenio pentametilciclopentadienil [Cp^*RuCl] que pueden catalizar la cicloadición de azidas a alquinos terminales, seleccionando específicamente la región y produciendo 1,2,3-triazoles 1,5-disustituidos (*véase* Rasmussen *et al.*, *Org. Lett.* 9:5337-5339, 2007). Además, y a diferencia de CuAAC, RuAAC también se puede utilizar con alquinos internos para proporcionar 1,2,3- triazoles completamente sustituidos.

Por tanto, determinadas realizaciones incluyen polipéptidos p97 que comprenden al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral azida o una cadena lateral alquina, que incluye aminoácidos artificiales internos y terminales (*por ejemplo*, N-terminal, C-terminal). Algunos de estos polipéptidos p97 pueden estar formados por la incorporación *in vivo* o *in vitro* (*por ejemplo*, sistemas libres de células) de aminoácidos artificiales que contienen cadenas laterales azidas o cadenas laterales alquinas. Entre los ejemplos de técnicas *in vivo* se incluyen técnicas de cultivo celular que utilizan, por ejemplo, *E. coli* modificados (*véase* Travis & Schultz, *The Journal of Biological Chemistry.* 285:11039-44, 2010; y Deiters & Schultz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 15:1521-1524, 2005), y entre los ejemplos de técnicas *in vitro* se incluyen sistemas libres de células (*véase* Bundy, *Bioconjug Chem.* 21:255-63, 2010).

En algunas realizaciones, un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral azida se conjuga por cicloadición azida - alquina a un agente (o enlace) que comprende al menos un grupo alquino, como un anticuerpo u otro agente polipéptido que comprende al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral alquina. En otras realizaciones, un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral alquina se conjuga por cicloadición azida-alquina con un anticuerpo u otro agente polipéptido (o enlace) que comprende al menos un grupo azida, como un agente polipéptido que comprende al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral azida. Por lo tanto, determinadas realizaciones incluyen conjugados que comprenden un polipéptido p97 unido covalentemente a un agente a través de un enlace 1,2,3-triazol.

Los conjugados p97 específicos se pueden formar por las siguientes reacciones basadas en CuAAC o basadas en RuAAC, para comprender las siguientes estructuras respectivas (I) o (II).



donde R es un polipéptido p97 y R¹ es un agente de interés (o enlace); o donde R es un agente de interés (o enlace) y R¹ es un polipéptido p97.

- 5 En determinadas realizaciones, el aminoácido artificial con la cadena lateral azida y/o el aminoácido artificial con una cadena lateral alquina son aminoácidos terminales (N-terminal, C-terminal). En determinadas realizaciones, uno o más de los aminoácidos artificiales son internos.

Por ejemplo, determinadas realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral azida conjugada a un agente que comprende un grupo alquino. Algunas realizaciones, incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral azida conjugada a un agente que comprende un grupo alquino. Realizaciones específicas incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral alquina conjugada a un agente que comprende un grupo lateral azido. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral alquina conjugada a un agente que comprende un grupo lateral azido. Algunas realizaciones, incluyen un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido artificial interno con una cadena lateral azida conjugada a un agente que comprende un grupo alquino. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido artificial interno con una cadena lateral alquina conjugada a un agente que comprende un grupo lateral azido.

Realizaciones específicas incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral azida conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral alquina.

Otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral azida conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral alquina. Todavía otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral azida conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral alquina. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral azida conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral alquina.

Otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral alquina conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral azida. Todavía otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral alquina conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral azida. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral alquina conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral azida. Todavía otras realizaciones incluyen un polipéptido p97 que comprende un aminoácido artificial C-terminal con una cadena lateral alquina conjugada a un agente polipéptido que comprende un aminoácido artificial N-terminal con una cadena lateral azida.

También se incluyen métodos de producir un conjugado p97, que comprenden: (a) realizar una cicloadición azida-alquina entre (i) un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral azida y un agente que comprende al menos un grupo alquino (por ejemplo, un aminoácido artificial con una cadena lateral alquina); o (ii) un polipéptido p97 que comprende al menos un aminoácido artificial con una cadena lateral alquina y un agente que comprende al menos un grupo azida (por ejemplo, un aminoácido artificial con una cadena lateral azida); y (b) aislar un conjugado p97 de la reacción, produciendo así un conjugado p97.

En el caso en el que el conjugado p97 es un polipéptido de fusión, el polipéptido de fusión puede estar preparado generalmente utilizando técnicas estándar. Sin embargo, preferiblemente, un polipéptido de fusión se expresa como un polipéptido recombinante en un sistema de expresión, descrito en el presente documento y conocido en la técnica. Los polipéptidos de fusión de la invención pueden contener una o varias copias de una secuencia polipéptida p97 y pueden contener una o múltiples copias de un agente basado en un polipéptido de interés (*por ejemplo*, un polipéptido de LSD), presente en cualquier configuración.

Para las proteínas de fusión, las secuencias de ADN que codifican el polipéptido p97, el agente polipéptido (*por ejemplo*, el polipéptido de LSD) y, opcionalmente, los componentes del enlace péptido se pueden ensamblar por separado y después ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipéptido está ligado, con o sin un enlace péptido, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica al otro u otros componentes polipéptidos de manera que los marcos de lectura de las secuencias están en fase. Las secuencias de ADN ligadas están enlazadas operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traslacionales. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN están situados a solo 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De forma similar, los codones de parada requeridos para finalizar las señales de conversión y transcripción de señales solo están presentes 3' en la secuencia de ADN que codifica la mayoría de polipéptidos C-terminal. Esto permite la conversión en un solo polipéptido de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Se pueden aplicar técnicas similares, principalmente la disposición de elementos regulatorios como promotores, codones de parada, y señales de terminación de transcripción, en la producción de recombinantes de proteínas que no sean de fusión, por ejemplo, polipéptidos p97 y agentes polipéptidos (*por ejemplo*, agentes anticuerpo) para la producción de conjugados que no sean de fusión.

Los polinucleótidos y los polinucleótidos de fusión de la invención pueden contener una o múltiples copias de un ácido nucleico que codifica una secuencia polipéptida p97 y/o puede contener una o múltiples copias de un ácido nucleico que codifica un agente polipéptido como un polipéptido de LSD.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido p97 sujeto, anticuerpo u otro agente polipéptido y/o fusión del polipéptido p97 se introducen directamente en una célula huésped, y la célula se incuba en condiciones suficientes para inducir la expresión del o los polipéptidos codificados. Las secuencias polipéptidas de esta divulgación se pueden preparar utilizando técnicas estándar bien conocidas para un experto, en combinación con las secuencias polipéptidas y de ácido nucleico que se proporcionan en este documento.

Por tanto, según determinadas realizaciones relacionadas, se proporciona una célula huésped recombinante que comprende un polinucleótido o un polinucleótido de fusión que codifica un polipéptido descrito aquí. La expresión de un polipéptido p97, polipéptido de LSD, o la fusión de un polipéptido de LSD p97 en la célula huésped se puede conseguir convenientemente mediante el cultivo en condiciones apropiadas de células huésped recombinantes que contienen el polinucleótido. Tras la producción por expresión, el o los polipéptidos se pueden aislar y/o purificar utilizando cualquier técnica adecuada y, a continuación, utilizarlos como se desee.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de hámster recién nacido, células HEK-293, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano común preferido es *E. coli*. La expresión de polipéptidos en células procariotas como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Puede verse una reseña, por ejemplo, en Pluckthun, *A. Bio/Technology*. 9:545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo está también disponible para el experto en la técnica como una opción para la producción recombinante de polipéptidos (véase Ref, *Curr. Opinion Biotech.* 4:573-576, 1993; y Trill *et al.*, *Curr. Opinion Biotech.* 6:553-560, 1995).

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias finalizadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias de mejora, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, *por ejemplo*, fago o fagémido, según proceda. Para obtener más información, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y la expresión génica y el análisis de las proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, 2ª edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992, o las posteriores actualizaciones de los mismos.

El término «célula huésped» se utiliza para referirse a una célula en la que se ha introducido, o en la que se puede haber introducido, una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más de los polipéptidos aquí descritos y que además exprese o pueda expresar un gen de interés seleccionado como, por ejemplo, un gen que codifica cualquier polipéptido aquí descrito. El término incluye la progenie de la célula parental, tanto si la progenie es o no idéntica en su morfología o en su composición genética al progenitor original, siempre que el gen seleccionado esté presente.

Las células huésped se pueden escoger por determinadas características, por ejemplo, la expresión de una enzima que genera formilglicina (FGE) para convertir un residuo de cisteína o serina dentro de un motivo de sulfatasa en un residuo de formilglicina (FGly), o la expresión de aminoacil tRNA sintetasa(s) que puede incorporar aminoácidos artificiales en el polipéptido, incluyendo aminoácidos artificiales con cadena lateral azida, cadena lateral alquína, u otras cadenas laterales deseadas para facilitar la conjugación.

Por consiguiente, también se contempla un método que comprende la introducción de dichos ácidos nucleicos en una célula huésped. La introducción de ácidos nucleicos puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucarióticas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, *por ejemplo*, virus de vacunas o, en el caso de células de insecto, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transformación de cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos. La introducción puede ser seguida produciendo o permitiendo la expresión del ácido nucleico, *por ejemplo*, mediante el cultivo de células huésped en condiciones para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico está integrado en el genoma (*por ejemplo*, el cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según técnicas estándar.

La presente invención también proporciona, en determinadas realizaciones, un método que comprende el uso de una estructura de ácido nucleico aquí descrita, en un sistema de expresión para expresar un polipéptido determinado, como un polipéptido p97, polipéptido de LSD, o una proteína de fusión de un polipéptido de LSD p97 como se describe en este documento.

Como se ha indicado anteriormente, determinados conjugados p97, como las proteínas de fusión, pueden emplear uno o más grupos de enlace, incluyendo enlaces no péptidos (*por ejemplo*, enlaces no proteínicos) y enlaces péptidos. Dichos enlaces pueden ser enlaces estables o enlaces liberables.

Ejemplos de enlaces estables no péptidos incluyen succinimida, ácido propiónico, enlaces de carboximetilato, éteres, carbamatos, amidas, aminas, carbamidas, imidas, uniones C-C alifáticas, enlaces de tioéter, tiocarbamatos, tiocarbamidas y similares. Generalmente, un enlace hidrolíticamente estable es aquel que presenta una tasa de hidrólisis inferior a aproximadamente del 1 al 2% al 5% por día en condiciones fisiológicas.

Los ejemplos de enlaces liberables no péptidos incluyen, enlaces de éster carboxilado, éster fosfato, anhídrido, acetal, cetel, aciloxialquil éter, imina, ortoéster, tioéster, tiol éster, carbonato e hidrazona. Las realizaciones ilustrativas adicionales de enlaces hidrolíticamente inestables o débiles incluyen, entre otras: $-\text{O}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_b-\text{O}-$, donde b es de 1 a 5, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2-(\text{CH}_2)_c-$, donde b es de 1 a 5 y c es de 2-5, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2-(\text{CH}_2)_c-\text{O}-$, donde b es de 1 a 5 y c es de 2-5, $-(\text{CH}_2)_b-\text{OPO}_3-(\text{CH}_2)_b-$, donde b es de 1 a 5 y b' es de 1 a 5, $-\text{C}(\text{O})-(\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO})_a-\text{NH}-\text{CHR}-$, donde a es de 2 a 20 y R es un sustituyente que se encuentra en un aminoácido a, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2-\text{CHCH}_2-\text{CH}_2-$, donde b es de 1 a 5, $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{N}-(\text{CH}_2)_b-\text{O}-$, donde b es de 1 a 5, y $-\text{O}-(\text{CH}_2)_b-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-(\text{CH}_2)_b-\text{O}-$, donde cada b es independientemente de 1 a 5.

Otros ejemplos ilustrativos de enlaces liberables pueden ser los enlaces basados en la eliminación de bencilo, enlaces basados en el bloqueo de trialquilo (o basados en la lactonización del bloqueo de trialquilo), enlaces basados en bicina y enlaces de ácido lábiles. Entre los enlaces ácido lábiles pueden estar la unión de disulfuro, enlaces que contienen hidrazona y enlaces que contienen tiopropionato.

También se incluyen enlaces que son liberables o divisibles durante o tras la internalización en una célula. Los mecanismos para la liberación celular de un agente de estos grupos de enlace incluyen la división por reducción de una unión de disulfuro (*por ejemplo*, la Patente USA n.º 4.489.710, concedida a Spittler), por irradiación de una unión fotolábil (*por ejemplo*, la Patente USA n.º 4.625.014, concedida a Senter *et al.*), por hidrólisis de una cadena lateral de aminoácidos derivada (*por ejemplo*, la Patente USA n.º 4.638.045, concedida a Kohn *et al.*), por hidrólisis mediada por complemento de suero (*por ejemplo*, la Patente USA n.º 4.671.958, concedida a Rodwell *et al.*), y la hidrólisis catalizada por ácido (*por ejemplo*, la Patente USA n.º 4.569.789, concedida a Blattler *et al.*). En una realización, se puede utilizar un enlace ácido lábil (*Cancer Research* 52:127-131, 1992; y la Patente USA n.º 5.208.020).

En determinadas realizaciones, se utilizan «polímeros solubles en agua» en un enlace para acoplar una secuencia polipeptídica p97 en un agente de interés. Un «polímero soluble en agua» se refiere a un polímero que es soluble en agua y normalmente es sustancialmente no inmunogénico, y normalmente tiene un peso molecular atómico superior a aproximadamente 1000 Daltons. La fijación de dos polipéptidos a través de un polímero soluble en agua puede ser deseable ya que dicha modificación puede aumentar el índice terapéutico, aumentando la vida media del suero, por ejemplo, incrementando la estabilidad proteolítica y/o disminuyendo el aclaramiento renal. Además, la fijación a través de uno o más polímeros puede reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas. Ejemplos específicos de polímeros solubles en agua incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol, polipropilenglicol y similares.

En algunas realizaciones, el polímero soluble en agua tiene un peso molecular hidrodinámico efectivo superior a aproximadamente 10.000 Da, superior a aproximadamente de 20.000 a 500.000 Da, superior a aproximadamente de 40.000 Da a 300.000 Da, superior a aproximadamente de 50.000 Da a 70.000 Da, normalmente superior a aproximadamente 60.000 Da. El «peso molecular hidrodinámico efectivo» se refiere al tamaño de agua-solvatada efectiva de una cadena de polímeros determinada por la cromatografía de exclusión por tamaños con base acuosa (SEC). Cuando el polímero soluble en agua contiene cadenas de polímeros que tienen unidades repetidas de óxido de polialquileno, como unidades repetidas de óxido de etileno, cada cadena puede tener un peso molecular atómico de entre aproximadamente 200 Da y aproximadamente 80.000 Da, o entre aproximadamente 1.500 Da y

aproximadamente 42.000 Da, siendo de especial interés que tengan hasta aproximadamente 20.000 Da. También se incluyen polímeros solubles en agua lineales, ramificados y terminalmente cargados.

Los polímeros útiles como enlaces entre polipéptidos marcados aldehído pueden tener una amplia gama de pesos moleculares, y subunidades de polímeros. Estas subunidades pueden incluir un polímero biológico, un polímero sintético, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de dichos polímeros solubles en agua incluyen: dextrano y derivados de dextrano, incluyendo sulfato de dextrano, dextrina reticulada P-amino y carboximetil dextrina, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y dextrinas y derivados e hidroilactos de almidón, polialquilenglicol y sus derivados, incluyendo polietilenglicol (PEG), metoxipolietilenglicol, polietilenglicol homopolímeros, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol con propilenglicol, donde dichos homopolímeros y copolímeros no son sustituidos o son sustituidos en un extremo con un grupo alquilo, heparina y fragmentos de heparina, alcohol polivinílico y éteres de etilo de polivinilo, polivinilpirrolidona, aspartamida y polioles polioxiethylados, con dextrano y derivados de dextrano, dextrina y derivados de dextrina. Se apreciará que también se incluyen diversos derivados de polímeros solubles en agua descritos específicamente.

Los polímeros solubles en agua son conocidos en la técnica, especialmente los polímeros con base de óxido de polialquileno como polietilenglicol "PEG" (véase Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1992); y Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, J. M. Harris & S. Zalipsky, Eds., ACS (1997); y las solicitudes internacionales de patentes: WO 90/13540, WO 92/00748, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28937, WO 95/11924, WO 96/00080, WO 96/23794, WO 98/07713, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/30727, WO 99/32134, WO 99/33483, WO 99/53951, WO 01/26692,

WO 95/13312, WO 96/21469, WO 97/03106, WO 99/45964, y las patentes USA n.º 4.179.337; 5.075.046; 5.089.261; 5.100.992; 5.134.192; 5.166.309; 5.171.264; 5.213.891; 5.219.564; 5.275.838; 5.281.698; 5.298.643; 5.312.808; 5.321.095; 5.324.844; 5.349.001; 5.352.756; 5.405.877; 5.455.027; 5.446.090; 5.470.829; 5.478.805; 5.567.422; 5.605.976; 5.612.460; 5.614.549; 5.618.528; 5.672.662; 5.637.749; 5.643.575; 5.650.388; 5.681.567; 5.686.110; 5.730.990; 5.739.208; 5.756.593; 5.808.096; 5.824.778; 5.824.784; 5.840.900; 5.874.500; 5.880.131; 5.900.461; 5.902.588; 5.919.442; 5.919.455; 5.932.462; 5.965.119; 5.965.566; 5.985.263; 5.990.237; 6.011.042; 6.013.283; 6.077.939; 6.113.906; 6.127.355; 6.177.087; 6.180.095; 6.194.580; 6.214.966).

Los ejemplos de polímeros de interés incluyen aquellos que contienen óxido de polialquileno, óxido de poliamida alquileno o derivados de los mismos, incluyendo óxido de polialquileno y óxido de poliamida alquileno que comprenden una unidad repetida de óxido de etileno de la fórmula $--(CH_2---O)--$. Ejemplos adicionales de polímeros de interés incluyen una poliamida con un peso molecular superior a aproximadamente 1000 Daltons de la fórmula $--[C(O)--X--C(O)--NH--Y--NH]_n--$ o $--[NH--Y--NH--C(O)--X--C(O)]_n--$, donde X e Y son radicales divalentes que pueden ser iguales o diferentes y pueden ser lineales o ramificados, y n es un número entero diferenciado de 2 a 100, normalmente de 2 a 50, y donde un valor X o Y, o ambos, se compone de una unidad repetida soluble en agua sustancialmente no antigénica que puede ser lineal o ramificada.

Ejemplos adicionales de unidades repetidas solubles en agua comprenden un óxido de etileno de la fórmula $--(CH_2--O)--$ o $--(CH_2---O)--$. El número de dichas unidades repetidas solubles en agua puede variar significativamente, el número habitual de dichas unidades es de 2 a 500, de 2 a 400, de 2 a 300, de 2 a 200, de 2 a 100, y más habitualmente de 2 a 50. Una realización de ejemplo es una en la que se selecciona un valor X e Y, o ambos, de: $--((CH_2)_{n1}--(CH_2---O)_{n2}--(CH_2)--$ o $--((CH_2)_{n1}--(O--CH_2--CH_2)_{n2}--(CH_2)_{n1}--)$, donde n1 es de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4 y más habitualmente de 1 a 3 y donde n2 es de 2 a 50, de 2 a 25, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 8, y más habitualmente de 2 a 5.

Una realización adicional de ejemplo es una en la que X es $--(CH_2--CH_2)--$, y donde Y es $--(CH_2--(CH_2---O)_3--CH_2---CH_2)--$ o $--(CH_2---(O--CH_2--CH_2)_3--CH_2)--$, entre otras variaciones.

En determinadas realizaciones, una secuencia de enlace péptido puede emplearse para separar o acoplar los componentes de un conjugado p97. Por ejemplo, para conjugados polipéptido-polipéptido, los enlaces péptidos pueden separar los componentes mediante una distancia suficiente para garantizar que cada polipéptido se pliega en su estructura secundaria y terciaria. Dicha secuencia de enlace péptido se puede incorporar en el conjugado (*por ejemplo*, proteína de fusión) utilizando técnicas estándar que se describen en el presente documento y son bien conocidas por el experto en la técnica. Las secuencias de enlace péptido adecuadas se pueden elegir en función de los siguientes factores: (1) su capacidad de adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con los epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptido; y (3) la falta de residuos hidrofóbicos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlaces incluyen aquellas que se describen en Maratea *et al.*, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83:8258-8262, 1986; la patente U.S. n.º 4.935.233 y la patente U.S. n.º 4.751.180.

En determinadas realizaciones ilustrativas, un enlace péptido está aproximadamente entre 1 a 5 aminoácidos, entre 5 a 10 aminoácidos, entre 5 a 25 aminoácidos, entre 5 a 50 aminoácidos, entre 10 a 25 aminoácidos, entre 10 y 50 aminoácidos, entre 10 a 100 aminoácidos, o cualquier rango intermedio de aminoácidos. En otras realizaciones ilustrativas, un enlace péptido comprende aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos en longitud. Los enlaces específicos pueden tener una longitud de aminoácidos total de

aproximadamente 1 a 200 aminoácidos, 1 a 150, aminoácidos, 1 a 100 aminoácidos, 1 a 90 aminoácidos, 1 a 80 aminoácidos, 1 a 70 aminoácidos, 1 a 60 aminoácidos, 1 a 50 aminoácidos, 1 a 40 aminoácidos, 1 a 30 aminoácidos, 1 a 20 aminoácidos, 1 a 10 aminoácidos, 1 a 5 aminoácidos, 1 a 4 aminoácidos, 1 a 3 aminoácidos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

Un enlace péptido puede emplear uno o más aminoácidos que se producen de forma natural, aminoácidos que no se producen de forma natural, aminoácidos análogos y/o aminoácidos miméticos como los que se describen en otra parte de este documento y son conocidos en la técnica. Determinadas secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlaces incluyen aquellas que se describen en Maratea *et al.*, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy *et al.*, *PNAS USA* 83:8258-8262, 1986; la patente USA n.º 4.935.233 y la patente USA n.º 4.751.180. Las secuencias de enlace péptido específicas contienen residuos de Gli, Ser, y/o Asn. Otros aminoácidos casi neutros, como Tr y Ala también se pueden emplear en la secuencia de enlace péptido, si se desea.

Determinados ejemplos de enlaces incluyen enlaces que contienen Gli, Ser y/o Asn, como sigue: enlaces [G]_x, [S]_x, [N]_x, [GS]_x, [GGS]_x, [GSS]_x, [GSGS]_x (ID SEC N.º:6), GGSG]_x(ID SEC N.º: 7), [GGGS]_x(ID SEC N.º:8), [GGGS]_x(ID SEC N.º:9), [GN]_x, [GNN]_x, [GNN]_x, [GNGN]_x(ID SEC N.º:10), [GGNG]_x(ID SEC N.º:11), [GGGN]_x(ID SEC N.º:12), [GGGGN]_x(ID SEC N.º:13), donde *x* es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más. Otras combinaciones de estos y otros aminoácidos relacionados serán evidentes para el experto en la técnica.

En realizaciones específicas, la secuencia de enlace comprende una secuencia de enlace Gli₃, que incluye tres residuos de glicina. En realizaciones específicas, los enlaces flexibles se pueden designar racionalmente utilizando un programa informático que pueda modelar ambos puntos de unión del ADN y los propios péptidos (Desjarlais & Berg, *PNAS*. 90:2256-2260, 1993; y *PNAS*. 91:11099-11103, 1994) o mediante métodos de visualización de fagos.

Los enlaces péptidos pueden ser fisiológicamente estables o pueden incluir un enlace liberable como un enlace fisiológicamente degradable o enzimáticamente degradable (*por ejemplo*, un enlace divisible proteolíticamente). En determinadas realizaciones, uno o más enlaces liberables pueden dar como resultado una vida media más corta y una eliminación más rápida del conjugado. Estas y otras realizaciones relacionadas se pueden utilizar, por ejemplo, para mejorar la duración de la solubilidad y la circulación de la sangre de conjugados p97 en el torrente sanguíneo, a la vez que también suministran un agente en el torrente sanguíneo (o a través de la BBB) que, después de la degradación del enlace, está sustancialmente libre de la secuencia p97. Estos aspectos son especialmente útiles en aquellos casos donde los polipéptidos u otros agentes, cuando se conjugan permanentemente con una secuencia de p97, demuestran una actividad reducida. Utilizando los enlaces tal como se describe en el presente documento, dichos anticuerpos pueden mantener su actividad terapéutica en forma conjugada. En estos y otros aspectos, las propiedades de los conjugados p97 pueden ser adaptadas de forma más eficaz para equilibrar la bioactividad y la vida media circulante de los anticuerpos a lo largo del tiempo.

Los enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones específicas de la presente invención incluyen, entre otros: una secuencia de aminoácidos dividida por una serina proteasa como trombina, quimotripsina, tripsina, elastasa, calicreína o subtilisina. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos divisibles por trombina incluyen, entre otros: -Gli-Arg-Gli-Asp-(ID SEC N.º:14), -Gli-Gli-Arg-, -Gli-Arg-Gli-Asp-Asn-Pro-(ID SEC N.º:15), -Gli-Arg-Gli-Asp-Ser-(ID SEC N.º:16), -Gli-Arg-Gli-Asp-Ser-Lis-(ID SEC N.º:17), -Gli-Pro-Arg-, -Val-Pro-Arg, y -Fe-Val-Arg-. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos divisibles por elastasa incluyen, entre otros: -Ala-Ala-Ala-, -Ala-Ala-Pro-Val-(ID SEC N.º:18), -Ala-Ala-Pro-Leu-(ID SEC N.º:19), -Ala-Ala-Pro-Fe- (ID SEC N.º:20), -Ala-Ala-Pro-Ala-(ID SEC N.º:21), y -Ala-Tir-Leu-Val-(ID SEC N.º:22).

Los enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones específicas de la presente invención también incluyen secuencias de aminoácidos que se pueden dividir por una matriz metaloproteínasa como colagenasa, estromelina y gelatinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos divisibles por una matriz metaloproteínasa incluyen, entre otros: -Gli-Pro-Y-Gli-Pro-Z-(ID SEC N.º:23), -Gli-Pro-, Leu-Gli-Pro-Z-(ID SEC N.º:24), -Gli-Pro-Ile-Gli-Pro-Z-(ID SEC N.º:25), y -Ala-Pro-Gli-Leu- Z-(ID SEC N.º: 26), donde Y Z son aminoácidos. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos divisibles por colagenasa incluyen, entre otros: -Pro-Leu-Gli-Pro-D-Arg-Z-(ID SEC N.º:27), -Pro- Leu-Gli-Leu-Leu-Gli-Z-(ID SEC N.º:28), -Pro-Gln-Gli-Ile-Ala-Gli-Trp-(ID SEC N.º:29), -Pro-Leu-Gli- Cis(Me)-His-(ID SEC N.º:30), -Pro-Leu-Gli-Leu-Tir-Ala-(ID SEC N.º:31), -Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg- (ID SEC N.º:32), y -Pro-Leu-Ala-Tir-Trp-Ala-Arg-(ID SEC N.º:33), donde Z es un aminoácido. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de aminoácidos divisible por estromelina es -Pro-Tir-Ala-Tir-Tir-Met-Arg- (ID SEC N.º:34); y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos divisible por gelatinasa es -Pro-Leu-Gli-Met- Tir- Ser-Arg- (ID SEC N.º:35).

Los enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones específicas de la presente invención también incluyen secuencias de aminoácidos que se pueden dividir por una enzima convertidora de angiotensina como, por ejemplo, -Asp-Lis-Pro-, -Gli-Asp-Lis-Pro-(ID SEC NO:36), y -Gli-Ser-Asp-Lis- Pro-(ID SEC NO:37).

Los enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones específicas de la presente invención también incluyen secuencias de aminoácidos que se pueden degradar por catepsina B, como, por ejemplo, -Val-Cit-, -Ala-Leu-Ala-Leu- (ID SEC N.º:38), -Gli-Fe-Leu-Gli- (ID SEC N.º:39) y -Fe-Lis-.

En determinadas realizaciones, sin embargo, uno o más de los enlaces péptidos y no péptidos es opcional. Por ejemplo, es posible que no sean necesarias secuencias de enlace en una proteína de fusión donde los primeros y segundos polipéptidos tienen regiones aminoácidas N-terminal y/o C-terminal no esenciales que se pueden utilizar para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.

5 Las propiedades funcionales de los polipéptidos p97 y los conjugados de polipéptidos p97 que se describen aquí se pueden evaluar utilizando una variedad de métodos conocidos por el experto en la técnica, *por ejemplo*, incluyendo, *por ejemplo*, ensayos de afinidad/unión (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, ensayos de inhibición competitiva). Por ejemplo, los conjugados aquí descritos se pueden probar por sus efectos sobre la internalización del receptor, eficacia *in vitro* e *in vivo*, etc., incluyendo la velocidad de transporte a través de la barrera hematoencefálica. Estas determinaciones pueden realizarse utilizando protocolos bien establecidos conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); o los kits disponibles comercialmente.

15 **Métodos de uso y composiciones farmacéuticas**

Determinadas realizaciones de la presente invención están relacionadas con el uso de las composiciones de proteínas del trastorno por depósito lisosómico (LSD) desfosforiladas y conjugados p97 relacionados que se describen en este documento. Ejemplos de dichos métodos incluyen métodos de tratamiento y métodos de diagnóstico, incluyendo por ejemplo, el uso de proteínas de LSD desfosforiladas o conjugados p97 relacionados para la toma de imágenes médicas de determinados órganos o tejidos, como los del sistema nervioso. Algunas realizaciones incluyen métodos de diagnóstico y/o tratamiento de trastornos o condiciones del sistema nervioso central (SNC), o trastornos o condiciones que tienen un componente del SNC. Aspectos específicos incluyen métodos de tratamiento de un trastorno por depósito lisosómico (LSD), incluyendo aquellos que tienen un componente del SNC.

25 Por consiguiente, determinadas realizaciones incluyen métodos de tratamiento de un sujeto que necesita de los mismos, que incluyen la administración de una composición que se compone de una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada que se describe aquí, o un conjugado p97 de la misma. También se incluyen métodos de administración de un agente en el sistema nervioso (*por ejemplo*, los tejidos del sistema nervioso central) de un sujeto, que comprenden la administración de una composición que contiene una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada que se describe en el presente documento, o un conjugado p97 de la misma. En determinadas de estas realizaciones y en otras relacionadas, los métodos aumentan la tasa de suministro del agente a los tejidos del sistema nervioso central, en relación, por ejemplo, al suministro mediante una composición que contiene una proteína de LSD relativamente o normalmente fosforilada o una proteína de LSD no conjugada.

35 En algunos casos, el sujeto tiene o está en riesgo de tener una enfermedad por depósito lisosómico. Determinados métodos se refieren al tratamiento de enfermedades por depósito lisosómico en un sujeto que necesita del mismo, opcionalmente aquellas enfermedades por depósito lisosómico asociadas con el sistema nervioso central, o en las que esté implicado el SNC. Ejemplos de enfermedades por depósito lisosómico incluyen mucopolisacaridosis tipo II (síndrome de Hunter), mucopolisacaridosis tipo I (síndrome de Hurler), aspartilglucosaminuria, enfermedad por depósito de ésteres de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipo I/II, enfermedad de Gaucher tipo I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de células globoides, enfermedad de Krabbe, enfermedad por depósito de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GMI tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff gangliosidosis GM2, -a-manosidosis tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolisacaridosis tipo I, sialidosis tipos I/II mucopolisacaridosis tipo II/III I-enfermedad celular, mucopolisacaridosis tipo NIC, polidistrofia pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis tipo NIB, mucopolisacaridosis tipo INC., mucopolisacaridosis tipo MID, mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis neuronal ceroida, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipos NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler, y enfermedad por depósito de ácido siálico. En estas realizaciones y en otras relacionadas, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada se puede administrar sola y/o como un conjugado p97, como se describe en el presente documento.

55 En aspectos específicos, la enfermedad por depósito lisosómico es mucopolisacaridosis tipo II (MPS II; o síndrome de Hunter) y la proteína de LSD es una forma sustancialmente desfosforilada de IDS humana. El síndrome de Hunter es un trastorno multisistémico ligado al cromosoma X caracterizado por la acumulación de glicosaminoglicanos (GAG). La gran mayoría de los individuos afectados son varones; en raras ocasiones las mujeres que son portadoras manifiestan los hallazgos. La edad de inicio, la gravedad de la enfermedad, y la tasa de progresión pueden variar significativamente.

60 En aquellos con enfermedad grave, la implicación del SNC (que se manifiesta principalmente por un progresivo deterioro cognitivo), la enfermedad de las vías respiratorias progresiva, y la enfermedad cardíaca normalmente

producen la muerte en la primera o segunda década de vida. Por tanto, determinadas realizaciones incluyen el tratamiento del síndrome de Hunter con implicación en el SNC.

En aquellos con enfermedad atenuada, el CNS no se ve afectado (o se ve mínimamente afectado), aunque el efecto de la acumulación de GAG en otros sistemas orgánicos puede ser tan grave como en aquellos que tienen un deterioro cognitivo progresivo. La supervivencia en los primeros años como adulto con una inteligencia normal es común en la forma atenuada de la enfermedad. Sin embargo, los sujetos con enfermedad atenuada siguen pudiendo beneficiarse de la administración de proteínas de LSD desfosforiladas (*por ejemplo*, IDS) al tener una mejor penetración en los tejidos del SNC, por ejemplo, para reducir el riesgo de progresión del síndrome de Hunter atenuado con respecto a la implicación del SNC.

Los hallazgos adicionales en ambas formas del síndrome de Hunter incluyen: baja estatura; macrocefalia con o sin hidrocefalia comunicante; macroglosia; voz ronca; pérdida de audición conductiva y neurosensorial; hepatomegalia y/o esplenomegalia; disostosis múltiple y contracturas articulares incluyendo anquilosis de la articulación temporomandibular; estenosis espinal; y síndrome del túnel carpiano. Por tanto, los sujetos sometidos a tratamiento con proteínas de LSD que se describen en este documento, pueden tener uno o más de estos hallazgos del síndrome de Hunter.

Los GAGs de orina y los exámenes del esqueleto pueden determinar la presencia de una condición de MPS, pero no son específicos de MPS II. La regla de oro para el diagnóstico de MPS II en un probando varón es la actividad enzimática del iduronato sulfatasa (IDS) deficiente en leucocitos, fibroblastos o plasma en presencia de actividad normal de al menos otra sulfatasa. Las pruebas de genética molecular de *IDS*, el único gen en el que la mutación se sabe que está asociada con el síndrome de Hunter, se pueden utilizar para confirmar el diagnóstico en un probando varón con un fenotipo inusual o un fenotipo que no coincide con los resultados de la prueba de GAG.

Los tratamientos comunes para el síndrome de Hunter incluyen terapia física, ocupacional y de desarrollo; derivación para hidrocefalia; amigdalectomía y adenoidectomía; ventilación de presión positiva (CPAP o traqueotomía); liberación del túnel carpiano; sustitución de la válvula cardíaca; reparación de la hernia inguinal. Por tanto, en determinados aspectos, un sujeto para el tratamiento mediante proteínas de LSD descrito aquí puede estar a punto de sufrir, estar sufriendo o haber sufrido uno o más de estos tratamientos.

La supervisión de la enfermedad puede depender de la implicación del sistema orgánico y la gravedad de la enfermedad, y normalmente incluye la evaluación cardíaca anual y ecocardiogramas; evaluaciones pulmonares incluyendo las pruebas de función pulmonar; audiogramas; exámenes oculares; evaluaciones del desarrollo; y exámenes neurológicos. Estudios adicionales podrían incluir estudios del sueño para la apnea obstructiva; velocidad de conducción nerviosa (NCV) para evaluar el síndrome del túnel carpiano; evaluaciones de hidrocefalia; evaluaciones ortopédicas para controlar las patologías de cadera. Por tanto, en algunos aspectos, un sujeto para el tratamiento mediante proteínas de LSD descrito aquí puede estar a punto de sufrir, estar sufriendo o haber sufrido uno o más de estos protocolos de supervisión de la enfermedad.

En otros aspectos, la LSD es mucopolisacaridosis tipo I (síndrome de Hurler) y la proteína de LSD es una forma sustancialmente desfosforilada de L-iduronidasa humana. La mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) es un trastorno multisistémico progresivo con características que contemplan un progreso de la gravedad. Aunque tradicionalmente se ha clasificado a las personas afectadas como que presentan uno de los tres síndromes MPS I, síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie, o síndrome de Scheie, no se han identificado diferencias bioquímicas y los hallazgos clínicos se solapan; por tanto, las personas afectadas se describen con mayor frecuencia como que presentan MPS I grave o atenuado, una distinción que influye en las opciones terapéuticas.

En MPS I graves, los bebés pueden parecer normales al nacer, y las primeras manifestaciones típicas son inespecíficas (*por ejemplo*, hernia umbilical o inguinal, infecciones frecuentes del tracto respiratorio superior antes de que cumplan 1 año). La tosquedad de los rasgos faciales pueden no ser evidente hasta después de cumplido un año de edad. La deformidad en forma de giba de la columna lumbosacra es habitual. La displasia esquelética progresiva (disostosis múltiple) que afecta a todos los huesos es universal. Al cumplir tres años, el crecimiento lineal cesa. La discapacidad intelectual es progresiva y profunda. La pérdida de audición es habitual. La muerte, normalmente producida por insuficiencia cardiorrespiratoria, se produce generalmente dentro de los primeros diez años de vida. En determinados aspectos, un sujeto sometido al tratamiento con proteínas de LSD descrito aquí puede tener MPS I grave, opcionalmente con implicación del SNC.

En MPS I atenuadas, la gravedad y la velocidad de progresión de la enfermedad incluyen desde graves complicaciones que ponen en peligro la vida y que llevan a la muerte en la segunda o tercera décadas a una vida normal complicada por discapacidad significativa debida a manifestaciones articulares progresivas. Aunque algunos individuos no tienen ninguna implicación neurológica y el desarrollo psicomotor puede ser normal en los primeros años de la infancia, pueden presentarse dificultades en el aprendizaje. El inicio clínico se produce normalmente entre los 3 y los 10 años de edad. La pérdida de audición y la enfermedad valvular cardíaca son habituales. En determinados aspectos, un sujeto sometido a tratamiento con proteínas de LSD descrito en el presente documento puede tener MPS I atenuada, opcionalmente con implicación del SNC.

El diagnóstico de MPS I se basa típicamente en la demostración de la actividad deficiente de la enzima lisosómica α -L-iduronidasa en leucocitos de sangre periférica, cultivo de fibroblastos, o plasma. Aumento de glicosaminoglicano (GAG) (*por ejemplo*, heparán y dermatán sulfato), la excreción urinaria es también una prueba preliminar útil. La prueba de genética molecular de *IDUA*, el único gen en el que se conoce actualmente que las mutaciones producen MPS I, está clínicamente disponible. Se espera que el análisis de secuencias identifique ambas mutaciones *IDUA* en la mayoría de personas con MPS I. Por tanto, los sujetos sometidos a tratamiento con las proteínas de LSD que se describen en este documento, pueden tener una o más de estas características de MPS I.

El tratamiento de las manifestaciones comunes de MPSI incluye programas de aprendizaje infantil/educación especial para el retraso en el desarrollo; gorras con viseras y gafas de sol para reducir el deslumbramiento; la sustitución de la válvula cardíaca si es necesario; terapia física, cirugía ortopédica si es necesario (sustitución osteoarticular, estabilización atlanto-occipital, descompresión del nervio mediano para el síndrome del túnel carpiano); desviación del líquido cefalorraquídeo (CSF) en la hidrocefalia; amigdalectomía y adenoidectomía para la disfunción de la trompa de Eustaquio y/o la obstrucción de las vías respiratorias superiores; traqueotomía para la apnea del sueño, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca derecha; tubos PE; y la intervención quirúrgica de la mielopatía cervical. Por tanto, en determinados aspectos, un sujeto para el tratamiento con proteínas de LSD descrito en este documento puede estar a punto de sufrir, estar sufriendo o haber sufrido uno o más de estos tratamientos.

El tratamiento o la prevención de las manifestaciones primarias de MPS I incluye el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), que en algunos niños con MPS I grave antes de cumplir los dos años puede aumentar la supervivencia, reducir la tosquedad facial y la hepatoesplenomegalia, mejorar la audición, y mantener la función cardíaca normal. El HSCT no suele mejorar las manifestaciones esqueléticas o la opacidad córnea. El HSCT pueden retardar el curso del deterioro cognitivo en niños con formas leves, aunque no significativas, de discapacidad cognitiva en el momento del trasplante. Por consiguiente, en algunos aspectos, un sujeto para el tratamiento con proteínas de LSD descrito aquí puede estar a punto de sufrir, está sufriendo o haber sufrido al menos un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT).

La supervisión de la enfermedad para MPS I puede depender de varios factores, pero puede incluir la supervisión temprana y continua del crecimiento de la cabeza en bebés y en niños; la prueba de velocidad de conducción del nervio mediano rutinaria; y la evaluación educativa de los niños con enfermedad atenuada antes de entrar en la escuela primaria. Las evaluaciones anuales pueden ser realizadas por cirujanos ortopédicos, neurólogos (cuando se ve afectada la médula espinal), oftalmólogos, cardiólogos (incluyendo ecocardiograma), audiólogos y otorrinolaringólogos. Por tanto, en algunos aspectos, un sujeto para el tratamiento mediante proteínas de LSD descrito aquí puede estar a punto de sufrir, estar sufriendo o haber sufrido uno o más de estos protocolos de monitorización de la enfermedad.

Para uso *in vivo*, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad humana, la toma de imágenes médicas, o la realización de pruebas, las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas y los conjugados p97 que se describen aquí se incorporan generalmente en una composición farmacéutica antes de su administración. Una composición farmacéutica consta de una o más de las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas o conjugados p97 que se describen aquí junto con un excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable.

Para preparar una composición farmacéutica, una cantidad efectiva o deseada de una o más de las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas o conjugados p97 se mezcla con cualquier excipiente o vehículo farmacéutico que el experto en la técnica sabe que es adecuado para el modo específico de administración. Un vehículo farmacéutico puede ser líquido, semi-líquido o sólido. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir, por ejemplo, un diluyente estéril (como el agua), una solución salina (*por ejemplo*, tampón fosfato salino; PBS), aceite fijado, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol o cualquier otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos (como alcohol bencílico y metilparabenos); antioxidantes (como ácido ascórbico y bisulfito de sodio) y agentes quelantes (como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones (como acetatos, citratos y fosfatos). Si se administra por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o tampón fosfato salino (PBS), y soluciones que contengan agentes espesantes y solubilizantes, como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

La administración de los polipéptidos y conjugados que se describen en este documento, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede llevarse a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes para servir utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar combinando un polipéptido o conjugado o composición que contenga un conjugado con un diluyente, excipiente o vehículo apropiado fisiológicamente aceptable, y se puede formular en preparativos en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, y aerosoles. Además, otros ingredientes farmacéuticos activos (incluyendo otros agentes anticancerígenos como los que se describen en otra parte de este documento) y/o excipientes adecuados como sales, tampones y estabilizadores pueden, aunque no es necesario, estar presentes en la composición.

La administración se puede conseguir de diversas maneras, ya sea por vía oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Los modos de administración preferidos dependen de la naturaleza de la condición que se va a tratar o a prevenir.

Los vehículos pueden incluir, por ejemplo, excipientes, estabilizadores o vehículos farmacéuticamente aceptables, que no sean tóxicos para la célula o el mamífero expuesto al mismo en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables se incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; un polipéptido de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona, aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos entre los que se incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar, como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal como sodio; y/o tensioactivos no iónicos como polisorbato 20 (TWEEN™), polietilenglicol (PEG) y poloxámeros (PLURONICS™) y similares.

En determinadas realizaciones, la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas y/o la secuencia del polipéptido p97, cada una de ellas individualmente o como un conjugado pre-existente, se unen o se encapsulan dentro de una partícula, *por ejemplo*, una nanopartícula, perla, formulación lipídica, partícula lipídica, o liposoma, *por ejemplo*, inmunoliposoma. Por ejemplo, en realizaciones específicas, la secuencia de polipéptido p97 se une a la superficie de una partícula, y la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada se une a la superficie de la partícula y/o se encapsula dentro de la partícula. En algunas de estas realizaciones y en otras relacionadas, el polipéptido p97 y la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas se enlazan covalentemente u operativamente entre sí solo a través de la propia partícula (*por ejemplo*, nanopartículas, liposomas), y no están ligadas covalentemente entre sí en cualquier otra forma; es decir, están unidas individualmente a la misma partícula. En otras realizaciones, el polipéptido p97 y la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas se conjugan primero covalentemente o no covalentemente entre sí, como se describe aquí (*por ejemplo*, a través de una molécula de enlace) y, a continuación, se unen o encapsulan dentro de una partícula (*por ejemplo*, inmunoliposoma, nanopartícula). En realizaciones específicas, la partícula es un liposoma, y la composición comprende uno o más polipéptidos p97, una o más proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas, y una mezcla de lípidos para formar un liposoma (*por ejemplo*, fosfolípidos, cadenas lipídicas mixtas con propiedades tensioactivas).

En algunos aspectos, el polipéptido p97 y la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas se mezclan individualmente con la mezcla de lípidos/liposomas, de tal manera que la formación de estructuras liposómicas enlaza operativamente el polipéptido p97 y la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas sin necesidad de una conjugación covalente. En otros aspectos, el polipéptido p97 y la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas se conjugan primero covalentemente o no covalentemente entre sí, como se describe aquí y, a continuación, se mezclan con lípidos para formar un liposoma. En otras realizaciones, la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas están unidas o encapsuladas dentro de una partícula, *por ejemplo*, una nanopartícula, perla, formulación lipídica, partícula lipídica, o liposomas, *por ejemplo*, inmunoliposoma sin ningún polipéptido p97. El polipéptido p97, la o las proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas y/o el conjugado del agente p97 pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980). La o las partículas o liposomas pueden comprender también otros agentes terapéuticos o de diagnóstico, como agentes citotóxicos.

La dosificación exacta y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de pruebas conocidos o mediante la realización de pruebas en las composiciones en sistemas modelo conocidos en la técnica y extrapolándolos de los mismos. También se pueden realizar ensayos clínicos controlados. Las dosis también pueden variar de acuerdo con la gravedad de la condición que se debe atenuar. Una composición farmacéutica se formula y administra generalmente para que ejerza un efecto terapéutico útil a la vez que minimice los efectos secundarios indeseables. La composición puede administrarse una sola vez, o se puede dividir en varias dosis más pequeñas para ser administrada a intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto en particular, se pueden ajustar los regímenes de dosificación específicos con el tiempo según las necesidades individuales.

Las vías típicas de administración de estas composiciones farmacéuticas y otras relacionadas incluyen, por tanto, sin limitación, la vía oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral tal y como se utiliza aquí incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraesternales o técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas según determinadas realizaciones de la presente invención están formuladas para permitir que los ingredientes activos contenidos en el presente documento estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente pueden presentarse en forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, una tableta puede ser una unidad de dosificación única, y un recipiente de un polipéptido o conjugado aquí descrito en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. Métodos reales de preparar estas formas de dosificación son conocidos, o serán aparentes para el experto en la técnica; por ejemplo,

véase *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición que se administrará, en todo caso, contendrá una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o conjugado descrito en este documento, para el tratamiento de una enfermedad o condición de interés.

5 Una composición farmacéutica puede presentarse en forma sólida o líquida. En una realización, el o los vehículos son partículas, de modo que las composiciones, por ejemplo, son en forma de tabletas o polvo. El o los vehículos pueden estar en forma líquida, y las composiciones pueden ser, por ejemplo, un aceite por vía oral, un líquido inyectable o un aerosol que es útil, por ejemplo, en la administración por vía inhalatoria. Cuando está prevista su administración por vía oral, la composición farmacéutica se presenta preferentemente en forma sólida o líquida, donde se incluyen las formas semi-sólidas, semi-líquidas, en suspensión y en forma de gel dentro de las formas que se consideran aquí como sólidas o líquidas.

10 Como composición sólida para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en forma de polvo, gránulos, tabletas de comprimidos, pastillas, cápsulas, goma de mascar, obleas o similares. Dicha composición sólida de forma típica contendrá uno o más diluyentes inertes o vehículos ingeribles. Además, uno o más de los siguientes componentes puede estar presente: aglutinantes como carboximetilcelulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; excipientes como almidón, lactosa o dextrina, agentes desintegradores como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes, como estearato de magnesio o Sterotex; fluidificantes como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante como la menta, el metilsalicilato o aromatizante de naranja; y un agente colorante. Cuando la composición farmacéutica se presenta en forma de cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido como polietilenglicol o aceite.

15 La composición farmacéutica puede presentarse en forma líquida, por ejemplo, elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede administrarse por vía oral o por inyección, por ejemplo. Cuando está prevista su administración por vía oral, la composición preferida, además de los compuestos presentes, contiene uno o más agentes edulcorantes, conservantes, tintes/colorantes y potenciadores del sabor. En una composición prevista para ser administrada por inyección, se pueden incluir uno o más tensioactivos, conservantes, agentes humectantes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, tampones, estabilizadores y agentes isotónicos.

20 Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otras formas similares, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles como agua para inyección, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro de sodio, aceites fijados como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o de plástico. La solución salina fisiológica es preferible como adyuvante. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

25 Una composición farmacéutica líquida destinada a la administración oral o parenteral debe contener una cantidad de proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o conjugado como los que se describen aquí, con el fin de obtener la dosificación adecuada. De forma típica, esta cantidad es al menos un 0,01% del agente de interés en la composición. Cuando está prevista su administración por vía oral, esta cantidad puede variar entre 0,1 y alrededor del 70% del peso de la composición. Algunas composiciones farmacéuticas orales contienen aproximadamente entre el 4% y el 75% del agente de interés. En determinadas realizaciones, se preparan composiciones farmacéuticas y preparaciones según la presente invención de modo que una unidad de dosificación parenteral contiene entre 0,01 a 10% en peso del agente de interés antes de la dilución.

30 La composición farmacéutica puede estar prevista para su administración tópica, en cuyo caso, el vehículo podrá comprender convenientemente una solución, emulsión, crema o gel base. La base, por ejemplo, puede incluir uno o más de los siguientes componentes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. En una composición farmacéutica pueden estar presentes agentes espesantes para la administración tópica. Si está prevista su administración por vía transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis.

35 La composición farmacéutica puede pretenderse que se administre por vía rectal, en forma, por ejemplo, de supositorio, que se disolverá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa, como un excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao, y polietilenglicol.

40 La composición farmacéutica puede incluir diversos materiales, que modifiquen la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una capa de recubrimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la capa de recubrimiento son típicamente inertes, y se pueden seleccionar, por ejemplo, a partir de azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entéricos. De forma alternativa, los ingredientes activos pueden estar contenidos en una cápsula de

gelatina. La composición farmacéutica en estado sólido o líquido puede incluir un agente que se une al conjugado o agente y contribuye así al suministro del compuesto. Los agentes idóneos que puedan actuar de este modo incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales, una o más proteínas o un liposoma.

La composición farmacéutica puede consistir esencialmente de unidades de dosificación que se pueden administrar como un aerosol. El término aerosol se utiliza para designar a una variedad de sistemas que van desde aquellos de naturaleza coloidal a sistemas compuestos de paquetes presurizados. El suministro puede ser por un gas licuado o comprimido o por un sistema de bombeo adecuado que dispense los ingredientes activos. Los aerosoles se pueden suministrar en sistemas de una sola fase, bifásicos, o trifásicos con el fin de suministrar el o los ingredientes activos. El suministro del aerosol incluye los recipientes, accionadores, válvulas, recipientes auxiliares, y componentes similares necesarios, que juntos pueden formar un kit. El experto en la técnica, sin experimentación indebida puede determinar los aerosoles preferidos.

Las composiciones que comprenden proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas o conjugados tal como se describen aquí se pueden preparar con vehículos que protegen las proteínas contra la rápida eliminación del cuerpo, como recubrimientos o formulaciones de liberación temporal. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada como, por ejemplo, entre otras, implantes y sistemas de suministro microencapsulados y polímeros biodegradables, biocompatibles, como acetato de vinilo-etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros conocidos por el experto en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar preparadas por métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica prevista para ser administrada por inyección se puede preparar combinando una composición que comprende una proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o conjugado como se describe aquí y, opcionalmente, una o más sales, tampones y/o estabilizadores, con agua destilada estéril para formar una solución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una suspensión o solución homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interactúan de un modo no covalente con la o las proteínas con el fin de facilitar la disolución o suspensión homogénea de la o las proteínas en el sistema de suministro acuoso.

Las composiciones pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva, que variará dependiendo de varios factores, incluyendo la actividad del compuesto específico (*por ejemplo*, proteína de LSD sustancialmente desfosforilada, conjugado) empleado; la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, y la dieta del paciente; el modo y momento de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad de la condición o el trastorno específico; y el sujeto que recibe terapia. Por lo general, una dosis diaria terapéuticamente efectiva (para un mamífero de 70 kg) es de aproximadamente 0,001 mg/kg (*es decir*, ~ 0,07 mg) a aproximadamente 100 mg/kg (*es decir*, ~ 7,0 g); preferiblemente, una dosis terapéuticamente efectiva (para un mamífero de 70 kg) es de aproximadamente 0,01 mg/kg (*es decir*, ~ 0,7 mg) a aproximadamente 50 mg/kg (*es decir*, ~ 3,5 g); más preferiblemente, una dosis terapéuticamente efectiva (para un mamífero de 70 kg) es de aproximadamente 1 mg/kg (*es decir*, ~ 70 mg) a aproximadamente 25 mg/kg (*es decir*, ~ 1,75 g).

Las composiciones que comprenden la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o conjugados que se describen aquí también se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos, como aquí se describe. Por ejemplo, en una realización, la proteína de LSD sustancialmente desfosforilada o conjugado se administra con un agente anti-inflamatorio. Los agentes anti-inflamatorios o fármacos incluyen, entre otros, esteroides y glucocorticoides (incluyendo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDS), que incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

Dicha terapia de combinación puede incluir la administración de una sola formulación de dosificación farmacéutica que contiene un compuesto de la invención y uno o más agentes activos, así como la administración de composiciones que comprenden conjugados de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica por separado. Por ejemplo, un conjugado como el que se describe aquí y el otro agente activo se pueden administrar al paciente juntos en una sola composición de dosificación oral como una tableta o cápsula, o cada agente se administra en formulaciones de dosificación oral por separado. De forma similar, un conjugado como el que se describe aquí y el otro agente activo se pueden administrar al paciente juntos en una sola composición de dosificación parenteral como una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable, o cada agente se administra en formulaciones de dosificación parenteral por separado. Cuando se utilizan formulaciones de dosificación por separado, las composiciones que comprenden proteínas de LSD sustancialmente desfosforiladas o conjugados y uno o más agentes activos se pueden administrar básicamente al mismo tiempo, *es decir*, simultáneamente, o por etapas escalonadas por separado, *es decir*, secuencialmente y en cualquier orden; la terapia de combinación se entiende que incluye todos estos regímenes.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y sin que se limiten únicamente a los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de iduronidasa desfosforilada (dpIDU)

La iduronidasa se trató con fosfatasa ácida de la patata (PAP) inmovilizada con Affigel para eliminar los grupos fosfato.

5 **Preparación de PAP inmovilizada en Affigel.** Siguiendo el protocolo proporcionado por BioRad de inmovilización de proteínas en Affigel, se puso 20 ml de suspensión Affigel nueva en un tubo de polipropileno con la parte superior de rosca de 50 ml y se lavó cinco veces con MilliQ H₂O. Se añadieron tres mililitros de H₂O y 0,83 ml de 3M NaOAc pH 5.2 a un volumen final de aproximadamente 25 ml. Se disolvieron 360 mg de PAP en 10 ml de 0,1 M NaOAc, y se retuvieron 0,5 ml para comprobar el OD inicial 280. La solución de PAP se añadió a la solución de Affigel, se mezcló y se colocó en un agitador rotatorio a 4°C para su incubación durante la noche.

10 A la mañana siguiente, el gel se sedimentó suavemente (*por ejemplo*, 400 rpm en una centrifugadora de banco durante 1-2 segundos, o se dejó en reposo para que el gel sedimentara). Se extrajo el sobrenadante y se conservó para comprobar el OD 280 final (comprobar la eficacia del enlace). Los sitios no enlazados se bloquearon en el gel añadiendo 20 ml de 1 M Tris HCl/Glicina pH 5.6, y se incubaron a 4 °C en un agitador rotatorio durante 3 horas. La solución de bloqueo se extrajo del gel y se lavó el gel 4 veces con 0,1 M NaOAc pH 5.2 + 0,01 % Polisorbato 80 (Tween 80). El gel se guardó a 4°C en 0,1 M NaOAc pH 5.2 + 0,01 % Polisorbato 80 (Tween 80) que contenía un 0,02% de azida de sodio.

Eliminación de grupos fosfato de IDU usando PAP inmovilizada.

20 El tampón se decantó del gel Affigel-PAP preparado. Para retirar la azida de sodio, se lavó el gel 4 veces con 15 ml de 0,1 M de tampón de acetato de sodio a un pH de 5.2 que contenía un 0,01% de Tween 80 (Polisorbato 80). El gel se compactó entre lavados haciéndolo girar suavemente en una centrifugadora de banco hasta 400 rpm durante 1 segundo.

25 La iduronidasa utilizada en todos los experimentos procedía del lote PD 000414 de Paul Fitzpatrick a 0,66 mg/ml por OD 280. Antes de la incubación con Affigel-PAP, se intercambiaba completamente la iduronidasa por tampón en 1 M de acetato de sodio pH 5.2 para extraer los fosfatos del tampón de almacenamiento de PBS ácido que, de lo contrario, podrían inhibir la desfosforilación. El intercambio de tampón para todas las reacciones de desfosforilación se llevó a cabo por diálisis durante la noche de 12 ml de IDU (sistema Pierce Slide-A-Lyzer, *cutoff* 10 K MW) a 0,66 mg/ml con 1 L de 0,1 M de acetato de sodio pH 5.2. El tampón de diálisis se intercambiaba dos veces durante el período de 24 horas.

30 Para la reacción de desfosforilación, se añadieron 12 ml de iduronidasa a 0,66 mg/ml en 0,1 M de acetato de sodio pH 5.2 y 10 ml de 0,1 M de acetato de sodio que contenía un 0,01% de polisorbato 80 al volumen de 15 ml de preparado Affigel-PAP en un tubo de polipropileno con la parte superior de rosca de 50 ml. La mezcla se incubó en la incubadora giratoria a 25 °C durante aproximadamente 21-24 horas, y el gel se colocó en una centrifugadora de banco para hacerlo girar suavemente a 400 rpm durante 1-2 segundos.

35 Se extrajo el sobrenadante que contenía la IDU desfosforilada, el gel se lavó 4 veces con 15 ml de 0,1 M de acetato de sodio a un pH de 5.2 que contenía un 0,001% de polisorbato 80, y se recuperaron todos los sobrenadantes. Los sobrenadantes (aproximadamente 70 -75 ml) se mezclaron y concentraron en un dispositivo Centricron (*cutoff* 10 K). Se llevó a cabo el intercambio de tampón en el tampón de formulación IDS (PBS ácido) para lograr un volumen final de aproximadamente 4-5 ml. Se añadió polisorbato 80 a una concentración final de 0,001%. A continuación, la composición se esterilizó después por filtración con un filtro de 0,22 µM.

Ejemplo 2**Preparación de conjugados p97 de iduronato-2-sulfatasa (dpIDS) desfosforilados**

Para preparar proteínas de prueba y conjugados etiquetados, se preparó dpIDS a partir de IDS recombinante vía tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) unida a perlas acrílicas para reducir el número de grupos fosfato.

45 La IDS recombinante (4,5 ml @ 1,5 mg/ml, producida en células HT-1080 humanas) se trató con perlas acrílicas CIP pre-equilibradas durante la noche a 37°C con un mezclado suave. Las perlas de CIP se transfirieron a una columna, se recogió el flujo continuo (FT) y se lavaron las perlas con aproximadamente 25 ml de PBS. Todo el FT y las fracciones de lavado se recogieron y se concentraron a 4,5 ml. A continuación, las perlas de CIP se reequilibraron con 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ pH 8.0 y se reutilizaron para otros sub-lotes de IDS. En el primer lote
50 utilizado para la conjugación se produjeron dpIDS (IDS desfosforiladas) tratadas con CIP de 29 mg. No se observó ninguna reducción de actividad específica para las dpIDS (véase Tabla 1). Sin embargo, se observó la reducción de la unión a un receptor de manosa-6-fosfato (sM6PR) soluble, medido por el ensayo de unión de placas y el análisis Biacore (véase Tabla 2, que muestra una reducción de 7 pliegues de la afinidad de unión de KD2, y una reducción de 2 pliegues de respuesta total (R_{max})). También se observó la reducción del contenido de manosa-6-fosfato
55 (M6P), medido por PAD-HPLC (véase Tabla 3, que muestra una reducción de 17 pliegues o del ~ 94 - 95% en contenido MP6).

Tabla 1. Actividad específica

Muestra	Actividad (U/mg)
IDS	6.143
Pool tratado CIP R1-R5 (dpIDS)	6.151

Tabla 2. Análisis Biacore de la unión a sM6PR

Muestra	KD1 (M)	KD2 (M)	Rmax1 (RU)	Rmax2 (RU)
IDS	5,82e-8	8,13e-10	123,2	70,27
dpIDS	3,21e-8	5,94e-9	71,42	43,19

Tabla 3. Contenido de M6P por PAD-HPLC

Muestra	pmol M6P/pmol de proteínas
IDS	2,56
dpIDS	0,15

5

Para la conjugación, se intercambiaron de tampón aproximadamente 28 mg (19,6 ml en 1,45 mg/ml) de dpIDS a 6,0 ml/minuto en 0,1 M de tampón de fosfato de potasio pH 4.5 en una columna Sephadex G25F de 2,6 x 33 cm. A continuación, se concentraron utilizando dos filtros Vivaspin 20 10 kDa. Este proceso produjo 16,5 ml de una solución dpIDS en 1,67 mg/ml como indica la espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,33 en esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de dpIDS (producto indicado = 28 mg). Se realizó un protocolo similar para preparar una solución inicial de IDS (fosforilado normalmente), que produjo 22 ml de una solución de IDS en 1,45 mg/ml. A continuación, estas proteínas se conjugaron en AlexaFluor 647 (AF647), p97 humano (melanotransferrina; MTf), o ambos, como se describe a continuación.

10

15

Incorporación de AF647 en dpIDS. A una solución de dpIDS (arriba) de 11,6 mg (6,96 ml) se añadió 2,0 mg (400 μ l) de una solución de 5,0 mg/ml de éster succinimida AlexaFluor 647 (Invitrogen A20006) en DMSO, equivalente a una relación AF647:dpIDS de 10:1. Se dejó actuar la reacción de activación durante 35 minutos a 20 °C, produciendo dpIDS etiquetado AF647 crudo. Se extrajeron y se purificaron 1,08 ml de la mezcla de reacción cruda (con 1,8 mg de dpIDS) en 50 mM de tampón de fosfato de potasio + 150 mM de cloruro de sodio, pH 6.7, en una columna Sephadex G25M PD-10 individual. Este proceso produjo 2,5 ml de una solución de dpIDS activado por AF647.

20

25

La solución se diafiltró utilizando un filtro Vivaspin 6 hasta que no era visible ningún color en el filtrado y, a continuación, se concentró para producir 1,31 ml de una solución dpIDS-AF647 con una concentración de 1,15 mg/ml, suponiendo una absorbancia de 1,33 en esta longitud de onda para una solución de dpIDS de 1 mg/ml (producto = mg) y una relación AF647:IDS de 2,08, suponiendo un coeficiente de extinción molar para AF647 de 239.000 L mol⁻¹ cm⁻¹ en 650 nm. Esta solución se filtró en 0,2 μ m. Este protocolo se utilizó también para incorporar AF647 en IDS normalmente fosforiladas.

30

Incorporación de maleimidas en dpIDS-AF647. A una parte del dpIDS etiquetado AF647 crudo (9,8 mg) se añadió 0,23 mg (113 μ l) de una solución de 2,0 mg/ml de 4-[N-maleimidometilo ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Thermo 22360) en DMSO, equivalente a una relación SMCC:dpIDS de 5:1. Se dejó continuar la reacción de activación dpIDS- AF647 durante 60 minutos a 20 °C, a continuación se aplacó durante 15 minutos a 20°C con 126 μ l de una solución de glicina acuosa de 10 mg/ml.

35

40

Los dpIDS-AF647 crudos activados por maleimida se purificaron a 6,0 ml/minuto en una columna Sephadex G50M de 2,6 x 23 cm utilizando 50 mM de fosfato de potasio, 150 mM de cloruro de sodio, y 5 mM de tampón EDTA con un pH de 7.0 como eluyente. Este proceso produjo 14,0 ml de una solución de dpIDS-AF647 activado por maleimida con una concentración de 0,69 mg/ml, suponiendo una absorbancia de 1,33 en esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de dpIDS (producto = 9,71 mg) y una relación AF647:dpIDS de 2,01, suponiendo un coeficiente de extinción molar para AF647 de 239.000 L mol⁻¹ cm⁻¹ a 650 nm. Se hizo un ensayo en una muestra para determinar el contenido de maleimida utilizando SAMSAs-fluoresceína, indicando una incorporación de 1,04 grupos maleimida por molécula dpIDS. Este protocolo se utilizó también para incorporar maleimidas en IDS-AF647 normalmente fosforiladas.

Conjugación p97 (MTf)-dpIDS-AF647. Se intercambiaron de tampón 220 mg de p97 soluble (MTf) a mg/ml en una columna Sephadex G25M de 2,6 x 34 cm en 0,1 M de tampón de fosfato de potasio pH 7.5. A continuación, se concentraron utilizando un filtro Vivaspin 20 10 kDa para producir 15,0 ml de una solución p97 a 13,91 mg/ml como indicó la espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y asumiendo una absorbancia de 1,19 en esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de p97 (rendimiento indicado = 209 mg).

Para la tiolación de p97, se descongelaron y equilibraron 46 mg (3,31 ml) de p97 a temperatura ambiente, y se añadieron 66 µl (0,33 mg) de una solución de 5,0 mg/ml de ácido S-acetiltioacético y succinimidilo éster (SATA, Thermo 26102) en DMSO, equivalente a una relación SATA:p97 de 2,5:1. Se dejó continuar la reacción de S-acetiltiolación durante 60 minutos a 20 °C. Se añadió una solución acuosa (0,33 ml) de sal disódica de 0,05 M EDTA y 2,5 M de clorhidrato de hidroxilamina, pH 7.0 para desproteger los tioles, y la reacción de desprotección se dejó actuar durante 15 minutos a 20°C.

El p97 crudo tiolado se purificó en dos columnas PC-10 Sephadex G25M desechables para quitar los subproductos de bajo peso molecular, utilizando 50 mM de fosfato de potasio, 150 mM de cloruro de sodio, 5 mM de tampón EDTA con un pH de 7.0 como eluyente. Este proceso produjo 6,0 ml de una solución de p97 tiolado con una concentración de 7,48 mg/ml como indica la espectrofotometría UV-visible a 280 nm, y suponiendo una absorbancia de 1,19 en esta longitud de onda para una solución de 1 mg/ml de p97 (producto indicado = 45 mg). Se hizo un ensayo en una muestra para determinar el contenido de tiol utilizando el reactivo de Ellman, indicando una incorporación de 0,9 grupos tiol por molécula de p97.

Para la conjugación de p97 a dpIDS-AF647, se dejaron reaccionar conjuntamente 9,2 mg de dpIDS-AF647 activado por maleimida y 17,8 mg de p97 tiolado (equivalente a una relación de p97:dpIDS de 1.8:1) durante 18 horas a 20 °C. La reacción de la conjugación se aplacó mediante la adición de 50 µl de una solución acuosa de 2,0 mg/ml de 2-mercaptoetanol (incubado durante 15 minutos a 20°C) y 32 µl de una solución acuosa de 10,0 mg/ml de N-etilmaleimida (incubada durante 15 minutos a 20°C).

El conjugado crudo (~16 ml) se filtró a 0,2 µm y se concentró a 4,0 ml utilizando un filtro Vivaspin 20 10 kDa. El conjugado crudo concentrado se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución utilizando una columna Superdex 20PG de 2,6 x 62 cm a 4,0 ml/min, con 50 mM de tampón de fosfato de potasio = 150 mM de cloruro de sodio (pH 6.7) como eluyente. Este protocolo se utilizó también para conjugar p97 a IDS-AF647 normalmente fosforilado.

Ejemplo 3

Distribución de iduronato-2-sulfatasa desfosforilado (dpIDS) y conjugados p97-dpIDU en tejido cerebral.

Se realizaron experimentos para evaluar la distribución de conjugados IDS, dpIDS, p97 (MTf)-IDS etiquetados AF647, y conjugados p97 (MTf)-dpIDS en compartimentos de tejido cerebral. Las proteínas etiquetadas AlexaFluor 647 (AF647) se inyectaron por vía intravenosa en ratones, según la tabla siguiente.

Tabla 4. Dosis inyectada para el estudio de dpIDS.

Agente	Ratones	MW aproximados (g/mole)	Dosis inyectada (mg/kg)	Dosis inyectada (moles/kg)
IDS-AF647	3	76.000	6	7,9e-8
^{dp} IDS-AF647	3	76.000	6	7,9e-8
MTf-IDS-AF647	3	158.000	12,5	7,9e-8
MTf- ^{dp} IDS-AF647	3	158.000	12,5	7,9e-8

Aproximadamente dos horas después de la inyección de proteínas de prueba etiquetadas, se llevó a cabo una perfusión cerebral intracardiaca para lavar la sangre de la vasculatura cerebral sin dañar la barrera hematoencefálica. Este procedimiento se realizó antes de diseccionar el cerebro y preparar el tejido cerebral para el estudio histológico y de biodistribución. Aquí se inyectó primero la lectina de tomate (100 µg) (inyección en la vena de la cola) en los ratones aproximadamente 10 minutos antes de la eutanasia. Se anestesió a los ratones con una inyección i.p. de ketamina y xilazina a una dosis de 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. A continuación, se administraron intraperitonealmente 40 µL de 100 unidades/mL de heparina. Una vez que los ratones perdieron el conocimiento, se humedecieron con etanol y se extrajo la caja torácica para exponer el corazón que seguía palpitando. Se extrajo la sangre de los ratones a través del ventrículo derecho mediante una jeringa de 1 ml equipada con una aguja de calibre 25. Se cortó la vena cava y/o el atrio derecho para permitir el drenaje de la perfusión circulante. Los ratones se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con una aguja de calibre 25 y una bomba de infusión (4 ml/min durante 2 - 5 minutos) hasta que se extrajo toda la sangre del hígado. El cuero cabelludo se dividió con un escalpelo de entre los ojos al cuello para exponer el cráneo. La médula espinal se cortó con el bisturí justo debajo del foramen magnum. Se utilizaron tijeras para cortar el cráneo desde el foramen magnum

lateralmente hacia los ojos y quitar la parte superior del cráneo. Se utilizó un fórceps curvo para vaciar el cerebro sin dañar el tejido.

El cerebro se cortó por la mitad a lo largo del plano sagital y se pesó cada mitad. Una mitad se integró en compuesto OCT para congelarla y la otra mitad se preparó para homogenización y medición de la fluorescencia en homogenados de tejido.

Los resultados se muestran en las Figuras 1, 2, y 5. La Figura 1 muestra los niveles de proteínas de prueba acumuladas en el parénquima cerebral de los ratones tras la inyección intravenosa (IDS, iduronato-2-sulfatasa; dpiIDS, iduronato-2-sulfatasa desfosforilado; MTf-IDS, conjugado de p97-IDS; MTf-dpiIDS, conjugado de p97-dpiIDS). La Figura 2 muestra la distribución de las proteínas de prueba entre el parénquima cerebral (dentro del BBB) y los capilares cerebrales (fuera del BBB) de los ratones tras la infección intravenosa. La Figura 5 muestra los niveles de IDS y dpiIDS en el parénquima cerebral, con y sin conjugación para p97 (MTf).

También se llevó a cabo un análisis ANOVA de 2 vías utilizando estos datos. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Tabla 5. ANOVA de 2 vías.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática
Conjugación MTf	1	8,16E-05	8,16E-05
Desfosforilación M6P	1	3,04E-05	3,04E-05
Interacción	1	1,74E-06	1,74E-06
Residual (error)	37	4,00E-05	1,08E-06
Total	40		

¿La conjugación p97 (MTf) afecta al resultado? La conjugación MTf representa aproximadamente un 53,10% de la variación total. $F = 75,52$. $DFn = 1$. $DFd = 37$. El valor P es $<0,0001$. Si la conjugación de MTf no tiene un efecto total, hay menos de un 0,01% de posibilidades de observar de forma aleatoria un efecto tan grande (o mayor) en un experimento de este tamaño. El efecto se considera extremadamente significativo.

¿La desfosforilación M6P afecta al resultado? La desfosforilación M6P representa aproximadamente un 19,75% de la variación total. $F = 28,09$. $DFn = 1$. $DFd = 37$. El valor P es $<0,0001$. Si la desfosforilación M6P no tiene un efecto total, hay menos de un 0,01% de posibilidades de observar de forma aleatoria un efecto tan grande (o mayor) en un experimento de este tamaño. El efecto se considera extremadamente significativo.

Según estos datos y análisis, las IDS desfosforiladas mostraron un aumento significativo de la penetración en el parénquima cerebral en relación con las IDS fosforiladas normalmente. Asimismo, los conjugados p97-dpiIDS mostraron un aumento significativo de la penetración en el parénquima cerebral en relación con los conjugados entre p97 e IDS fosforiladas normalmente. Por tanto, la extracción de grupos fosfatos aumentó significativamente la transferencia de IDS a través de la BBB, tanto si se administraron solos o como un conjugado p97.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> biOasis Technologies, Inc.

5 <120>PROTEÍNAS DESFOSFORILADAS DE LA ENFERMEDAD POR DEPÓSITO LISOSÓMICO Y MÉTODOS DE
USO DE LAS MISMAS

<130> BIOA-006/OIWO

<150> US 61/677.959

<151> 31-07-2012

10

<160> 39

<170> Versión de la patente 3.5

<210> 1

15 <211> 738

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 647 082 T3

<400> 1

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr
 1 5 10 15

Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu
 20 25 30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile
 35 40 45

Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val
 50 55 60

Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
 85 90 95

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
 100 105 110

Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys
 115 120 125

Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val
 130 135 140

Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val
 145 150 155 160

ES 2 647 082 T3

Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala
 165 170 175
 Gly Glu Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp
 180 185 190
 Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr
 195 200 205
 Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val
 210 215 220
 Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr
 225 230 235 240
 Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu
 245 250 255
 Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His
 260 265 270
 Leu Ala Arg Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp
 275 280 285
 Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser
 290 295 300
 His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln
 305 310 315 320
 Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala
 325 330 335
 Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met
 340 345 350
 Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp
 355 360 365
 Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val
 370 375 380
 Ala Phe Arg Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala
 385 390 395 400
 Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp
 405 410 415

ES 2 647 082 T3

Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr
420 425 430

Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser
435 440 445

Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala
450 455 460

Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe
465 470 475 480

Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg
485 490 495

Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu
500 505 510

Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro
515 520 525

Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys
530 535 540

Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe
545 550 555 560

Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr
565 570 575

Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala
580 585 590

Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
595 600 605

Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro
610 615 620

His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly
625 630 635 640

Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
645 650 655

Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu
660 665 670

ES 2 647 082 T3

Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr
675 680 685

Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met
690 695 700

Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro
705 710 715 720

Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro
725 730 735

Ala Leu

<210> 2

<211> 525

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 647 082 T3

<400> 2

Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu
 1 5 10 15

Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
 20 25 30

Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu
 35 40 45

Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val
 50 55 60

Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
 65 70 75 80

Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln
 85 90 95

Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe
 100 105 110

His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp
 115 120 125

Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys
 130 135 140

ES 2 647 082 T3

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

<400> 3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

Gln Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

ES 2 647 082 T3

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

ES 2 647 082 T3

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

ES 2 647 082 T3

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 4

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo de sulfatasa

10

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido o ausente

15

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Cis o Ser

20

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

25

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Pro o Ala

30

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

5

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivos de sulfatasa

15 <220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido o ausente

20 <220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Formilglicina

25 <220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido o ausente

30 <220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Pro o Ala

35 <220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 5

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Ser

<400> 6

Gly Ser Gly Ser
1

10 <210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Ser

<400> 7

Gly Gly Ser Gly
1

<223> 8

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Ejemplos de enlace Gli Ser

<400> 8

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 9

<211> 5

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Ser

5

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Asn

<400> 10

Gly Asn Gly Asn
1

15

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Asn

<400> 11

Gly Gly Asn Gly
1

25

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Asn

<400> 12

Gly Gly Gly Asn
1

<210> 13

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ejemplos de enlace Gli Asn

10

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Asn
1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por trombina

<400> 14

Gly Arg Gly Asp
1

20

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por trombina

<400> 15

Gly Arg Gly Asp Asn Pro
1 5

30 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por trombina

<400> 16

Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

<210> 17

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por trombina

15

<400> 17

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
1 5

<210> 18

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por elastasa

25

<400> 18

Ala Ala Pro Val
1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por elastasa

<400> 19

Ala Ala Pro Leu
1

<210> 20

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por elastasa

10

<400> 20

Ala Ala Pro Phe
1

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por elastasa

<400> 21

Ala Ala Pro Ala
1

20

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por elastasa

<400> 22

Ala Tyr Leu Val
1

30 <210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por matriz de metaloproteinasa

5

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

10

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

15

<400> 23

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por matriz de metaloproteinasa

<220>

25

<221> VAR_CHARACTER

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

30 <400> 24

Gly Pro Leu Gly Pro Xaa
1 5

<210> 25

<211> 6

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por matriz de metaloproteínasa

<220>

<221> VAR_CHARACTER

5 <222> (6).. (6)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 25

Gly Pro Ile Gly Pro Xaa
1 5

<210> 26

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por matriz de metaloproteínasa

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (5)..(5)

20 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 26

Ala Pro Gly Leu Xaa
1 5

<210> 27

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (7).. (7)

35 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 27

Pro Leu Gly Pro Asp Arg Xaa

1

5

<210> 28

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

10

<220>

<221> VAR_CHARACTER

<222> (7).. (7)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

15

<400> 28

Pro Leu Gly Leu Leu Gly Xaa

1

5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

<400> 29

Pro Gln Gly Ile Ala Gly Trp

1

5

25

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

<400> 30

Pro Leu Gly Cys His
1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

<400> 31

Pro Leu Gly Leu Tyr Ala
1 5

10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

<400> 32

Pro Leu Ala Leu Trp Ala Arg
1 5

20

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por colagenasa

<400> 33

Pro Leu Ala Tyr Trp Ala Arg
1 5

30

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por estromelisin

<400> 34

Pro Tyr Ala Tyr Tyr Met Arg
1 5

5 <210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por gelatinasa

<400> 35

Pro Leu Gly Met Tyr Ser Arg
1 5

<210> 36

15 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por enzima convertidora de angiotensina

<400> 36

Gly Asp Lys Pro
1

<210> 37

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por enzima convertidora de angiotensina

30

<400> 37

Gly Ser Asp Lys Pro
1 5

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por catepsia B

<400> 38

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 39

<211> 4

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlace enzimáticamente degradable - divisible por catepsia B

15

<400> 39

Gly Phe Leu Gly

1

20

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana aislada producido en una célula de fibrosarcoma HT- 1080 humana que está al menos un 75% desfosforilada y que tiene sustancialmente el mismo grado de glicosilación, o número de glicanos, en relación a un polipéptido de IDS producido en una célula de fibrosarcoma HT-1080.
- 5 2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, donde el polipéptido de IDS está sustancialmente libre de residuos de manosa-1-fosfato (M6P) en relación con un polipéptido de IDS producido en una célula de fibrosarcoma HT-1080.
3. El polipéptido aislado de la reivindicación 2, donde el polipéptido de IDS comprende un contenido de M6P inferior a 1,2 pmol M6P/pmol de proteína IDS.
- 10 4. El polipéptido aislado de la reivindicación 3, donde el polipéptido de IDS comprende un contenido de M6P inferior a 0,5 pmol M6P/pmol de proteína IDS.
5. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde el polipéptido de IDS comprende un contenido de M6P inferior a 0,15 pmol M6P/pmol de proteína IDS.
6. El polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido de IDS está desfosforilado por digestión enzimática con una fosfatasa ácida o una fosfatasa alcalina.
- 15 7. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, donde la IDS humana es al menos un 90% idéntica a la ID SEC N°:2.
8. Un conjugado que comprende un polipéptido p97 que está enlazado covalentemente u operativamente a un polipéptido de IDS de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para formar un conjugado p97.
9. Una composición que comprende un polipéptido de IDS aislada o conjugado p97 de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, compuesto por un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 10. Una composición de la reivindicación 9 para el uso en un método de tratamiento de la mucopolisacaridosis tipo II (Síndrome de Hunter), en un sujeto que necesite del mismo, que incluye la administración de dicha composición al sujeto.
11. Un método de producir iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana sustancialmente desfosforilada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende producir recombinantemente la IDS humana en una célula de fibrosarcoma HT- 1080, y tratar la IDS humana que se ha producido recombinantemente con una fosfatasa durante un tiempo suficiente para reducir el contenido de manosa-6-fosfato (M6P) de la IDS humana al menos un 75%, en relación con un polipéptido de IDS producido en una célula de fibrosarcoma HT-1080.
- 25 12. El método de la reivindicación 11, donde la IDS comprende o se compone de la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°:2.
- 30 13. El método de la reivindicación 11 o 12, donde la fosfatasa es una fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP).
14. El método de la reivindicación 13, donde la CIP está unida a perlas acrílicas.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-14 donde la IDS humana se fusiona a una secuencia de p97 humano.
- 35 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-14 donde el método además comprende la conjugación de las IDS a un polipéptido p97 humano.
17. Un polipéptido de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana aislado de la reivindicación 1, donde el polipéptido de IDS comprende o se compone de la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°:2, o una variante de la misma, y donde el contenido de manosa-6-fosfato (M6P) es inferior a 1,2 pmol M6P/pmol de proteína IDS.
- 40 18. Un polipéptido de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana aislada de la reivindicación 17, donde el contenido de M6P es inferior a 0,5 pmol M6P/pmol de proteína IDS.
19. Un polipéptido de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana aislada de la reivindicación 18, donde el contenido de M6P es 0,15 pmol M6P/pmol de proteína IDS, o inferior.

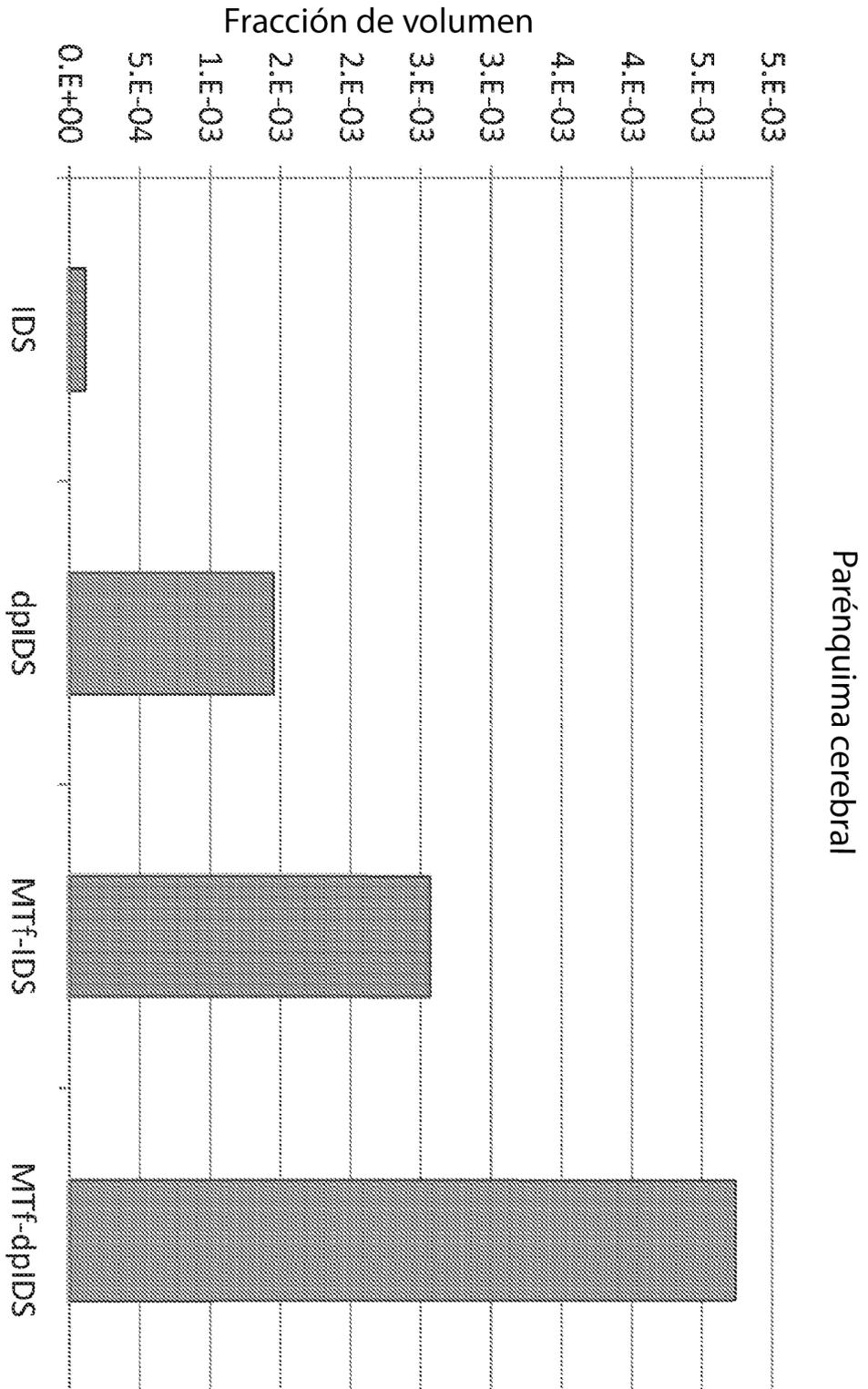


Fig 1

Distribución cerebral

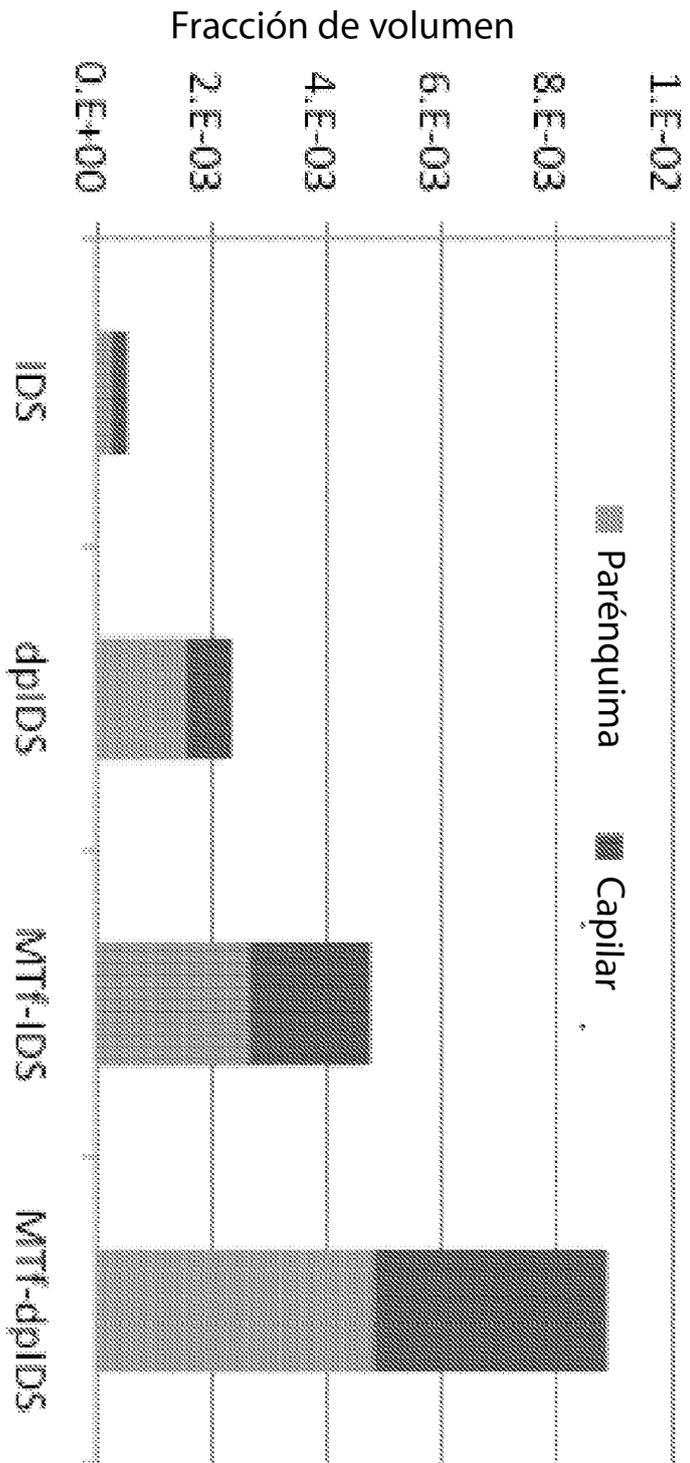


Fig 2

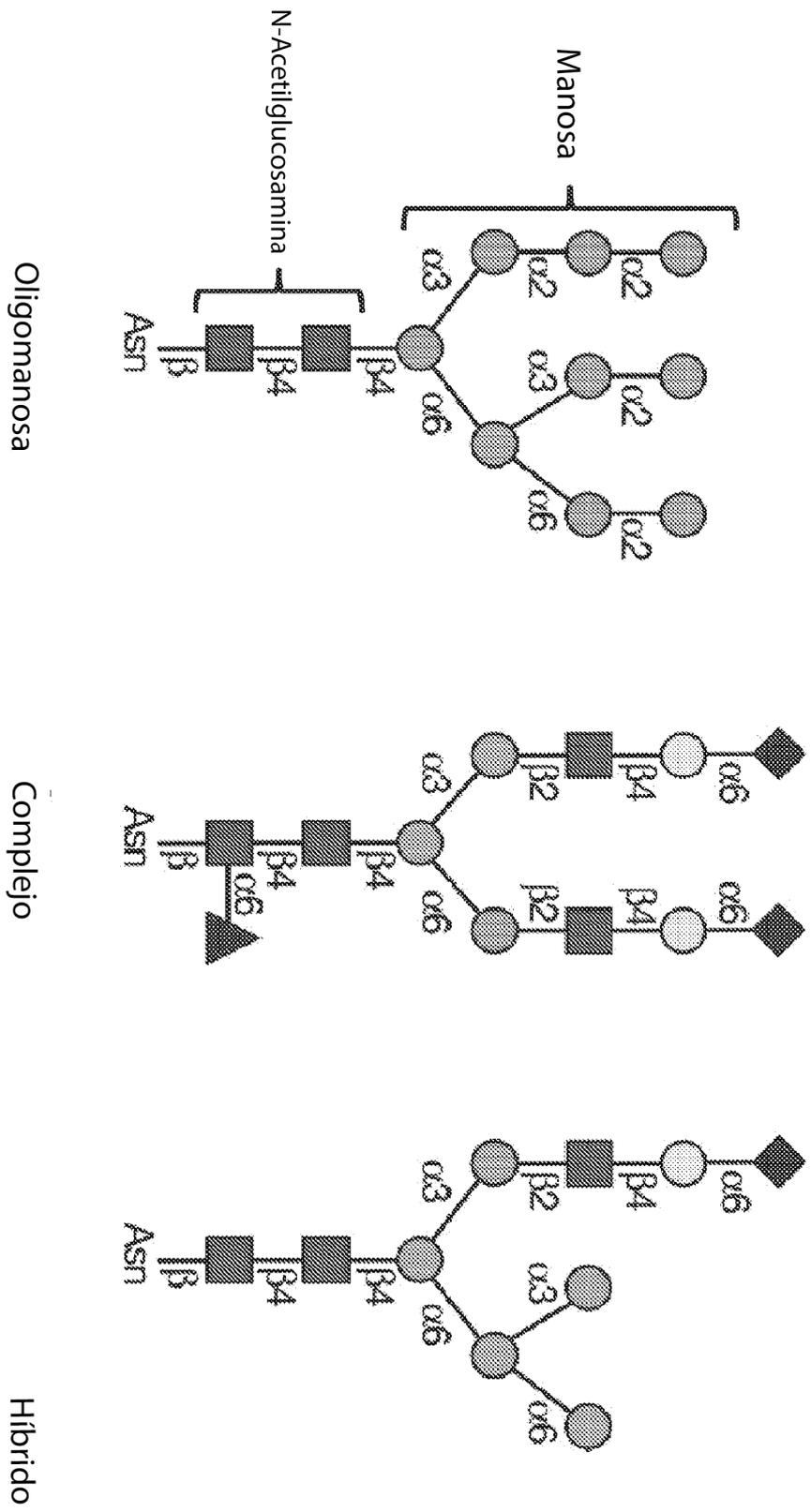


Fig 3

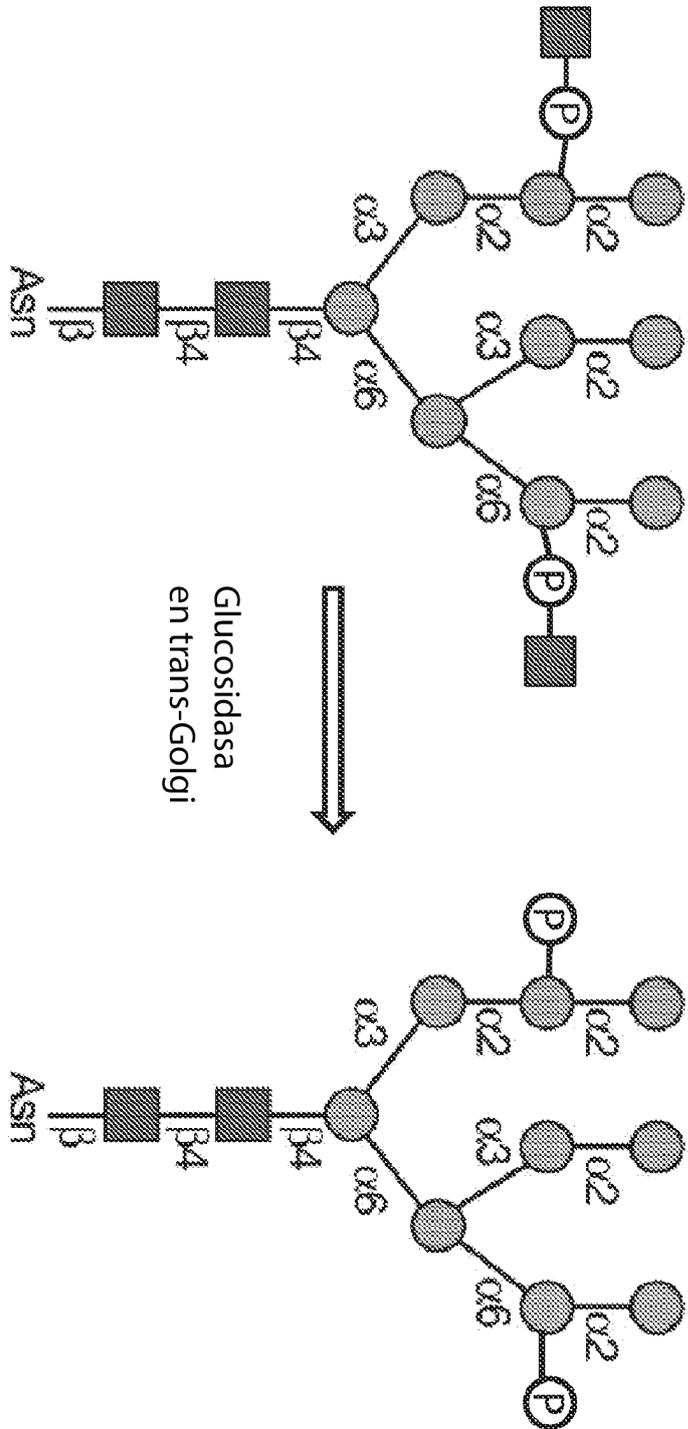


Fig 4

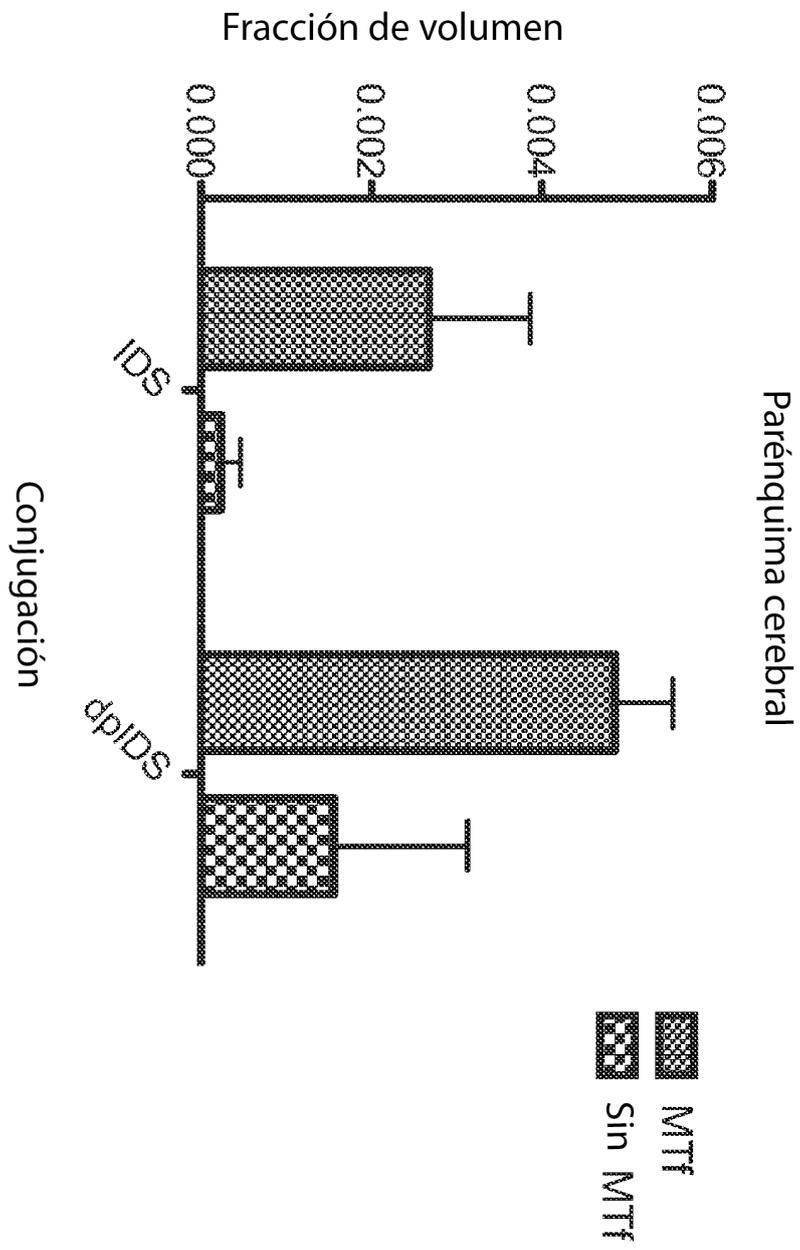


Fig 5

Secuencia de aminoácidos de Idursulfasa

1 Ser Gln Thr Thr Gln Ala **Asp** Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp
 21 Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gln Cys Tyr Gln Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp
 41 Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala
 61 Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gln Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
 81 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gln **Met** Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Gln
 101 Asn Gln Tyr Val Thr Met Ser Val Gln Lys Val Phe His Pro Gln Tyr Ile Ser Ser **Met** His
 121 Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Gln Lys Tyr
 141 Gln Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gln Pro Asp Gln Gln Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
 161 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Gln Gln Phe Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Gln Gln Ala
 181 Ile Gln Leu Leu Gln Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Ser Ala Val Gln Tyr
 201 His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Gln Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Gln
 221 **Met** Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Gln Val Pro Asp Gln Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
 241 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Gln Asp Val Gln Ala Leu **Met** Ile Ser Val Pro Tyr
 261 Gln Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser
 281 Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gln Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala **Met**
 301 Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gln Tyr Ala Leu Gln His Gln Gln Trp
 321 Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gln
 341 Arg Thr Ala Ser Leu Pro Gln Ala Gln Gln Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp
 361 Ser Ala Ser Gln Leu Met Gln Pro Gln Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Gln Leu Val Ser
 381 Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gln Lys Leu Ala Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
 401 Ser Phe His Val Gln Leu Cys Arg Gln Gln Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg
 421 Asp Leu Gln Gln Asp Pro Tyr Leu Pro Gln Asn Pro Arg Gln Leu Ile Ala Tyr Ser Gln
 441 Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile
 461 Lys Ile Met Gln Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gln His
 481 Asn Pro Asp Gln Phe Leu Ala **Met** Phe Ser Asp Ile His Ala Gln Gln Leu Tyr Phe Val
 501 Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr **Met** Asp Ser Gln Gln Gln Asp Leu Phe
 521 Gln Leu Leu Met Pro

Met - Puntos de marcas de N-glicosilación

Fig 6