

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 646**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2005 PCT/DK2005/000228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2005 WO05094874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2005 E 05715146 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 1740204**

54 Título: **Uso medicinal de alfa-manosidasa**

30 Prioridad:

01.04.2004 DK 200400528

01.04.2004 US 558108 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.06.2018

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)

Via Palermo 26/A

43122 Parma, IT

72 Inventor/es:

ANDERSSON, CLAES;

FOGH, JENS;

WEIGELT, CECILIA;

ROCES, DIEGO, PRIETO;

VON FIGURA, KURT y

IRANI, MEHER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 672 646 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

Uso medicinal de alfa-manosidasa

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona medios y estrategias para tratar el trastorno de almacenamiento lisosómico, alfa-manosidosis, mediante terapia de reemplazo enzimático. En particular, la invención se refiere a la reducción de oligosacáridos ricos en manosa neutros almacenados en células dentro del sistema nervioso central.

10

Antecedentes de la invención

Alfa-manosidosis

15 La alfa-manosidosis es una enfermedad autosómica recesiva que ocurre en todo el mundo con una frecuencia de entre 1/1.000.000 y 1/500.000. La manosidosis se encuentra en todos los grupos étnicos en Europa, América, África y también en Asia. Se detecta en todos los países con un buen servicio de diagnóstico para trastornos de almacenamiento lisosómico, con una frecuencia similar. Nacen aparentemente saludables, sin embargo, los síntomas de las enfermedades son progresivos. La alfa-manosidosis muestra heterogeneidad clínica, que varía desde formas muy graves a formas muy leves. Los síntomas clínicos típicos son: retraso mental, cambios esqueléticos, sistema inmune defectuoso que da lugar a infecciones recurrentes, deterioro de la audición y, a menudo, la enfermedad se asocia con características faciales típicas, como una cara gruesa, una frente prominente, un puente nasal aplanado, una nariz pequeña y una boca ancha. En los casos más graves (manosidosis tipo I) los niños sufren de hepatoesplenomegalia y mueren durante los primeros años de vida. Posiblemente esta muerte temprana sea causada por infecciones severas debido a la inmunodeficiencia causada por la enfermedad. En casos más leves (manosidosis tipo 2) los pacientes generalmente alcanzan la edad adulta. Las debilidades esqueléticas de los pacientes resultan en la necesidad de sillas de ruedas entre los 20 y 40 años. La enfermedad causa una disfunción difusa del cerebro que a menudo resulta en desempeños mentales débiles que excluyen todo menos las habilidades más básicas de lectura y escritura simples. Estos problemas asociados con las discapacidades auditivas y otras manifestaciones clínicas impiden que el paciente tenga una vida independiente, y la consecuencia es que se necesitan cuidados de por vida.

30

Alfa-manosidasa lisosómica

35 La alfa-manosidosis resulta de una actividad deficiente de la alfa-manosidasa lisosómica (LAMAN, EC3.2.1.24). La enfermedad se caracteriza por una acumulación intracelular masiva de oligosacáridos ricos en manosa, es decir, oligosacáridos que llevan residuos α 1,2-, α 1,3- y α 1,6- manosilo en sus terminales no reductoras. Estos oligosacáridos se originan principalmente a partir de la degradación intralisosómica de glicoproteínas con oligosacáridos unidos a N. Sin embargo, algunos se originan del catabolismo de oligosacáridos ligados a dolicol y de glicoproteínas mal plegadas redirigidas al citosol para su degradación por el proteasoma (4, 5). El almacenamiento lisosómico se observa en una amplia gama de tipos de células y tejidos, incluidas las neuronas en todas las regiones del cerebro. LAMAN es una exoglicosidasa que hidroliza estos residuos terminales, no reductores de alfa-D-manosa en alfa-D-manosidos del extremo no reductor durante la degradación ordenada de las glicoproteínas ligadas a N (Aronson y Kuranda FASEB J 3: 2615-2622. 1989). La enzima humana se sintetiza como un único polipéptido de 1.011 aminoácidos con un péptido señal putativo de 49 residuos que se procesa en tres glicopéptidos principales de 15, 42 y 70 kD. (Nilssen et al. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997).

40

45

El gen de alfa-manosidasa lisosómica

50 El gen que codifica LAMAN (MANB) se encuentra en el cromosoma 19 (19cen-q12), (Kaneda et al., Chromosoma 95:8-12. 1987). MANB consta de 24 exones, que abarcan 21,5 kb (números de acceso de GenBank U60885-U60899, Riise et al., Genomics 42:200-207. 1997). La transcripción de LAMAN es de >>3.500 nucleótidos (nts) y contiene un marco de lectura abierto que codifica 1.011 aminoácidos (GenBank U60266.1).

55 La clonación y secuenciación del ADNc humano que codifica LAMAN se ha publicado en tres documentos (Nilssen et al., Hum.Mol.Genet. 6, 717-726, 1997; Liao et al., J. Biol.Chem. 271, 28348-28358. 1996; Nebes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 239-245. 1994). Curiosamente, las tres secuencias no son idénticas. Cuando se compara con la secuencia de Nilssen et al. (número de acceso U60266.1), Liao et al. y Nebes et al. encontraron un cambio de TA a AT en las posiciones 1.670 y 1.671 que resulta en una sustitución de la valina por el ácido aspártico.

60

Mutaciones

65 En 1997 Nilssen et al. (Hum Mol Genet 6: 717-726) informaron la primera enfermedad que causa la mutación en los fibroblastos de dos hermanos con manosidosis en una familia palestina altamente endogámica. En estos dos pacientes, la causa de la enfermedad es una mutación puntual en el gen, con el nucleótido adenina sustituido con

timidina. Desde entonces, se han encontrado varias causas genéticas de la enfermedad en humanos. Hoy las mutaciones que causan la alfa-manosidosis se han caracterizado en más de 60 pacientes, principalmente en europeos. Estas mutaciones varían tanto en tipo, que abarca las sustituciones, eliminaciones y adiciones de nucleótidos y que abarcan la mayoría de los 24 exones del gen (Berg et al., Am J Genet 64: 77-88. 1999).

Las consecuencias de las mutaciones en el nivel de proteína también varían, desde las sustituciones de aminoácidos que afectan tanto al sitio activo como al plegamiento, hasta cambios de marco tempranos y codones de parada prematuros, dando como resultado un producto completamente inactivo.

La secuencia de aminoácidos y la estructura de la enzima en varias especies diferentes. Al comparar especies, muchas de las mutaciones humanas y bovinas encontradas se localizan en una región altamente "conservada" del polipéptido manosidasa para varias especies como el humano, el ganado, el gato, la ballena, el pájaro, el bacalao y el moho mucilaginoso, lo que indica que estas regiones son muy importantes para la función de la enzima.

A pesar de los muchos tipos diferentes de mutaciones, parece que todas las mutaciones causan una pérdida completa similar de actividad enzimática en las células. Por lo tanto, aparentemente, las variaciones con respecto a la gravedad clínica no pueden explicarse por variaciones en la actividad de la enzima. Por el contrario, estas variaciones son causadas por otros factores, que se atribuyen a la capacidad general del organismo para regular los efectos desagradables de la acumulación de oligomanósidos y por los entornos para prevenir y tratar infecciones y otros síntomas clínicos en los pacientes.

Diagnóstico

El diagnóstico de alfa-manosidosis se basa actualmente en la evaluación clínica, la detección de oligosacáridos ricos en manosa en la orina y las mediciones directas de la actividad de la alfa-manosidasa en diversos tipos de células, como leucocitos, fibroblastos y amniocitos (Chester et al., In: Durand P, O'Brian J (eds) Genetic errors of glycoprotein metabolism. Edi-Ermes, Milan, pp 89-120. 1982; Thomas and Beaudet . In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WA, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 5. McGraw-Hill, New York, pp 2529-2562. 1995).

Debido a que los síntomas inicialmente son a menudo leves y el diagnóstico bioquímico es difícil, el diagnóstico con frecuencia se realiza tarde en el curso de la enfermedad. Es obvio que los pacientes y sus familias se beneficiarían sustancialmente de un diagnóstico precoz.

Modelos animales

Se ha descrito la alfa-manosidosis en ganado bovino (Hocking et al. Biochem J 128:69-78. 1972), gatos (Walkley et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994), y cobayas (Crawley et al. Pediatr Res 46: 501- 509, 1999). Recientemente se generó un modelo de ratón por disrupción selectiva del gen de la alfa-manosidasa (Stinchi et al. Hum Mol Genet 8: 1366-72, 1999).

Al igual que en los humanos, la alfa manosidasa parece ser causada por mutaciones específicas en el gen que codifica la alfa-manosidasa lisosómica. Berg et al. (Biochem J. 328: 863-870.1997) reportaron la purificación de la alfa-manosidasa lisosómica hepática felina y la determinación de su secuencia de ADNc. La enzima activa consta de 3 polipéptidos, con masas moleculares de 72, 41 y 12 kD. De manera similar a la enzima humana, se demostró que la enzima felina se sintetiza como un precursor de cadena sencilla con un péptido señal putativo de 50 aminoácidos seguido de una cadena polipeptídica de 957 aminoácidos, que se escinde en los 3 polipéptidos de la enzima madura. La secuencia de aminoácidos deducida fue 81,1% y 83,2% idéntica con las secuencias humana y bovina, respectivamente. Se identificó una eliminación de 4 bp en un gato persa afectado; la eliminación dio como resultado un desplazamiento del marco del codón 583 y una terminación prematura en el codón 645. No se pudo detectar actividad enzimática en el hígado del gato. Un gato doméstico de pelo largo que expresaba un fenotipo más leve tenía una actividad enzimática del 2% de lo normal; este gato no poseía la eliminación de 4 bp. Tollersrud et al. (Eur J Biochem 246: 410-419. 1997) purificó la enzima de riñón bovino a homogeneidad y clonó el gen. El gen se organizó en 24 exones que abarcaron 16 kb. En base a la secuencia del gen, identificaron dos mutaciones en ganado.

En este momento, los ratones anulados de α -manosidasa proporcionan el mejor modelo farmacológico disponible para el tratamiento de investigación de la α -manosidosis para respaldar la presentación regulatoria. Los modelos aceptables que no usan animales vivos no existen actualmente.

Necesidad médica de terapia contra alfa-manosidosis

A la luz de las graves manifestaciones clínicas que resultan de la acumulación de oligosacáridos ricos en manosa, la falta de tratamiento efectivo para la alfa-manosidosis es bien reconocida. En la actualidad, las principales opciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad son el trasplante de médula ósea y la terapia de reemplazo enzimático.

Trasplante de médula ósea

En 1996, Walkley et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994) publicaron un artículo sobre 3 gatitos con mannosidosis que se trataron con trasplante de médula ósea (BMT) en 1991. En los 2 animales que se sacrificaron se observó una normalización, no solo en el cuerpo, sino más importante, también en el cerebro. El 3er gato estaba bien después de 6 años. Normalmente, un gato no tratado muere con 3-6 meses. En 1987, un niño con mannosidosis se trató con BMT (Will et al. Arch Dis Child 1987 Oct; 62(10): 1044-9). Murió después de 18 semanas debido a complicaciones relacionadas con el procedimiento. En el cerebro, se encontró poca actividad enzimática. Este resultado decepcionante podría explicarse por un tratamiento inmunosupresor intenso antes de la muerte, o porque toma tiempo para que la actividad de la enzima aumente en el cerebro después de BMT. El donante fue la madre (que como portador debe esperarse que tiene menos del 50% de actividad enzimática) o puede ser que en el humano, BMT no tiene ningún efecto sobre la función de la enzima en el cerebro. A pesar de tener resultados variables, los pocos intentos de trasplante de médula ósea han indicado que un injerto exitoso puede corregir las manifestaciones clínicas de la alfa mannosidosis, al menos en parte. Sin embargo, el desafío de reducir las complicaciones graves relacionadas con el procedimiento al aplicar el trasplante de médula ósea en la terapia humana aún está por vencer.

Terapia de reemplazo de enzimas

Cuando se descubrieron enfermedades de almacenamiento lisosómico, surgieron esperanzas de que esto podría tratarse mediante sustitución enzimática. La terapia de reemplazo de enzimas ha demostrado ser eficiente en la enfermedad de Gaucher. Cuando se inyecta glucocerebrosidasa lisosómica exógena en el paciente, esta enzima es captada por células deficientes en enzima (Barton et al. N Engl J Med 324:1464-1470). Tal absorción está regulada por ciertos receptores en la superficie celular como, por ejemplo, el receptor manosa-6-fosfato, que es casi ubicuo en la superficie de las células y otros receptores como el receptor asialoglicoproteína y el receptor de manosa, que están restringidos a ciertos tipos de células tales como células de la línea celular de monocitos/macrófagos y hepatocitos. La absorción celular de la enzima es, por lo tanto, fuertemente dependiente de su perfil de glucosilación. Si se diseña correctamente, la enzima deficiente podría reemplazarse por inyecciones regulares de enzima exógena de la misma manera que los pacientes diabéticos reciben insulina. Los estudios in vitro con la alfa-manosidasa lisosómica activa purificada añadida a los medios de fibroblastos deficientes en enzimas mostraron una corrección de la acumulación de sustrato lisosómico. El tratamiento in vivo, por otro lado, se ha visto obstaculizado en parte por el problema de producir la cantidad suficiente de enzimas y por complicaciones resultantes de reacciones inmunitarias contra la enzima exógena. Sin embargo, lo más importante es que se aplican consideraciones especiales en relación con las enfermedades de almacenamiento lisosómico con un componente neurológico importante, como la alfa-manosidosis, en el que las manifestaciones clínicas están relacionadas con un mayor almacenamiento lisosómico dentro del sistema nervioso central. Por lo tanto, la terapia de reemplazo enzimático no ha demostrado ser efectiva contra la variante neuronopática aguda de la enfermedad de Gaucher (Prows et al. Am J Med Genet 71:16-21).

La administración de enzimas terapéuticas al cerebro se previene por la ausencia de transporte de estas moléculas grandes a través de la barrera hematoencefálica. A partir de la noción general de que la barrera hematoencefálica debe eludirse para ver un efecto de los agentes terapéuticos en el cerebro, se ha contemplado el uso de una gran diversidad de sistemas de administración. Estos incluyen técnicas invasivas tales como la apertura osmótica de la barrera hematoencefálica con, por ejemplo, manitol y técnicas no invasivas tales como la endocitosis mediada por receptor de enzimas quiméricas. Como se espera que el reemplazo enzimático requiera la administración de la enzima de manera regular, se debe evitar el uso de técnicas invasivas. El uso de técnicas no invasivas, por otro lado, no ha proporcionado resultados prometedores. Se ha contemplado que la reducción del almacenamiento en los órganos viscerales y en las meninges podría reducir la cantidad de oligosacáridos que se llevan al cerebro. Tales consideraciones, sin embargo, no se consideran aplicables a los trastornos lisosómicos en los que el daño neurológico es primario y grave (Neufeld, EF, terapia de reemplazo de enzimas, en " Lysosomal disorders of the brain (Platt, F. M. Walkley, S. V: eds Oxford University Press). Por consiguiente, la búsqueda de un tratamiento efectivo de la alfa-manosidosis todavía está en curso.

El documento WO 02/099092 (Fogh et al., 2002) y Berg et al., Molecular Genetics and Metabolism, vol. 73, no. 1, abril de 2001, páginas 18-29, divulga el uso de una alfa-manosidasa lisosómica (LAMAN) para la preparación de un medicamento para reducir los niveles intracelulares de oligosacáridos ricos en manosa dentro del SNC mediante la administración de LAMAN "sobre membranas celulares".

Fogh et al., 2002, discute la terapia de reemplazo enzimático y divulga que si se diseña correctamente, la enzima faltante podría inyectarse regularmente como el sujeto diabético inyecta insulina. Además, Fogh et al., 2002 y Berg et al., 2001, divulgan la expresión y purificación de LAMAN humano a partir de células CHO y demuestran la absorción de LAMAN in vitro en fibroblastos de un paciente con mannosidosis. Sin embargo, Fogh et al., 2002, y Berg et al., 2001, no divulgan la administración mediante inyección intravenosa repetida a una frecuencia específica.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente invención proporciona el uso de una alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alfa-manosidosis, en el que dicho medicamento se administra por administración intravenosa.

Una realización de la presente invención se refiere al uso, en el que el medicamento debe administrarse por infusión, o

inyección intravenosa repetida en una frecuencia correspondiente a 1 a 5 inyecciones diarias, 1 a 5 inyecciones por semana, 1 a 5 inyecciones cada 2 semanas o 1 a 5 inyecciones cada mes.

Una segunda realización de la presente invención se refiere al uso, en el que dicho medicamento no comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse a las células dentro del sistema nervioso central.

Una tercera realización de la presente invención se refiere al uso, en el que la alfa-manosidasa lisosómica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso, en el que dicho medicamento no comprende un componente para el direccionamiento de células dentro del sistema nervioso central y no comprende un componente con la capacidad de actuar como vehículo para el paso sobre la barrera hematoencefálica.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso, en el que dicho medicamento se administra en una cantidad, que está dentro del intervalo de 5 a 300 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal del sujeto a tratar.

Otra realización más de la presente invención se refiere al uso, en el que una fracción de dicha alfa-manosidasa lisosómica consiste en alfa-manosidasa lisosómica que tiene uno o más oligosacáridos ligados a N que llevan residuos de manosa-6-fosfato.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso, en el que dicha alfa-manosidasa lisosómica es una enzima recombinante.

Definiciones y términos

Por "componente" se entiende, en términos generales, un elemento que forma parte del todo. Más específicamente, el término se refiere a una sustancia presente en una mezcla. Tal sustancia puede ser un compuesto definido como un material formado a partir de elementos químicamente combinados en proporciones definidas por masa. Ejemplos de compuestos, compuestos inorgánicos tales como especies de moléculas pequeñas, compuestos orgánicos tales como carbohidratos que incluyen azúcares simples y polímeros complejos de polisacáridos, péptidos, proteínas, peptidomiméticos, ácidos nucleicos y anticuerpos.

El término "sistema nervioso central" se refiere al cerebro, la médula espinal y los nervios espinales. El sistema nervioso central no incluye los nervios periféricos en los brazos, piernas, músculos y órganos.

En el presente contexto, el término "cerebro" se refiere a la parte del sistema nervioso central que se encuentra dentro del cráneo, incluyendo sus dos mitades (derecha e izquierda) denominadas hemisferios.

También en el presente contexto, las células extraneurales, como las células en el endotelio y el epitelio del plexo coroideo, no deben considerarse partes del sistema nervioso central y el cerebro. Además, el cerebro y el sistema nervioso central no comprenden las meninges.

El "plexo coroideo" es una proliferación vascular o franja de la tela coroidea en los ventrículos cerebrales tercero, cuarto y lateral; secreta fluido cerebroespinal, regulando de este modo hasta cierto punto la presión intraventricular.

El término "meninges" se refiere a las tres membranas que cubren el cerebro y la médula espinal. La meninge exterior se llama duramadre y es la más resistente de las tres. La capa central es la piamadre, y la capa interna más delgada es la aracnoidea.

Por "complejo" o "conjugado" se entiende una molécula o un grupo de moléculas que se mantienen juntas mediante enlaces de van der Waal y/o electrostáticos y/o covalentes.

El término "exógeno" se refiere a un componente que se introduce desde o se produce fuera del organismo o sistema; específicamente, el término se refiere a componentes no sintetizados dentro del organismo o sistema.

El término "permeante" se refiere a un componente, que puede pasar a través de una membrana semipermeable particular. Dichas membranas semipermeables pueden ser la barrera hematoencefálica y/o la barrera feto-materna.

Los términos "barrera hematoencefálica" y "barrera hematocerebral" se refieren al sistema de barrera que separa la sangre del parénquima del sistema nervioso central.

El término "direccionamiento" se refiere al proceso de que las proteínas contengan ciertas señales de manera que las proteínas se dirijan específicamente hacia ciertas ubicaciones celulares, por ejemplo, el lisosoma.

Descripción detallada

La característica distintiva de la α -manosidosis es el almacenamiento de oligosacáridos neutros en una amplia variedad de tejidos (véase la figura 2, carril 1 y carril 2). Estos oligosacáridos contienen 2-9 residuos de manosa y un residuo de N-acetilglucosamina en su terminal reductor y, por lo tanto, resultan de la acción de una endoglucosaminidasa. La fuerte implicación del sistema nervioso central se refleja en el fenotipo clínico de la alfa-manosidosis que oscila desde formas infantiles severas a formas juveniles más leves con solo retraso mental moderado. El razonamiento detrás de la presente invención surge de la sorprendente observación de que la administración intravenosa repetida de alfa-manosidasa recombinante da como resultado una marcada reducción en los niveles de oligosacáridos ricos en manosa neutros almacenados en el cerebro.

En su aspecto más amplio, la presente divulgación se relaciona a un polipéptido LAMAN recombinante y a una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido LAMAN, a un sistema de expresión capaz de expresar el polipéptido así como a composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido o parte de él y al uso del polipéptido para prevenir o tratar el desarrollo de síntomas relacionados con la alfa-manosidosis causados por una deficiencia, en un sujeto, de la enzima alfa-manosidasa lisosómica (LAMAN).

En un aspecto principal, la invención proporciona el uso de una alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento para reducir los niveles intracelulares de oligosacáridos ricos en manosa neutros en células dentro de una o más regiones del sistema nervioso central, tales como una o más regiones dentro del cerebro. Los oligosacáridos ricos en manosa neutros contienen dos a nueve residuos de manosa unidos a un único residuo de N-acetilglucosamina.

Otro aspecto principal de la invención se refiere a una formulación de una alfa-manosidasa lisosómica para uso como medicamento para reducir los niveles intracelulares de oligosacáridos ricos en manosa neutros en células dentro de una o más regiones del sistema nervioso central.

Para ambos aspectos principales de la invención, se prefiere adicionalmente que la alfa-manosidasa lisosómica se selecciona del grupo que consiste en

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- (b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante
- (c) un análogo de la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y que al mismo tiempo es enzimáticamente equivalente a la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante.

Se puede preferir que el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de ácido nucleico comprendida dentro de la célula de acuerdo con la invención y la SEQ ID NO: 1 sea al menos 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95 %, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

En el presente contexto, un análogo de secuencia de aminoácidos o una porción de una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante, es un polipéptido, que tiene una actividad específica de al menos 5 U/mg cuando está presente en una pureza de al menos 90%. La pureza se determina convenientemente usando técnicas convencionales tales como SDS-PAGE. La actividad específica se puede determinar en un ensayo enzimático como se describe en el ejemplo 2 de la presente solicitud. En resumen, el polipéptido purificado se incuba con el sustrato, p-nitrofenil- α -manopiranosido a 37 °C durante un período de tiempo apropiado antes de detener la reacción mediante la adición de 0,4 M de glicina/NaOH pH 10,4. La cantidad de sustrato convertido puede determinarse por el cambio de absorbancia a 405 nm ($\epsilon=18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

En algunas realizaciones, la alfa-manosidasa lisosómica se formula para administración sistémica. Las formulaciones para administración sistémica pueden comprender una diversidad de portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores "farmacéuticamente aceptables" no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y para las presentes aplicaciones también están presentes en concentraciones que no tienen ningún efecto sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se incluyen reguladores como fosfato, citrato y otros

ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, PLURONICST o polietilenglicol (PEG).

El tratamiento exitoso de la alfa-manosidosis debe abordar eficazmente los desafíos planteados por el sistema nervioso central y en particular la barrera hematoencefálica, ya que previene la entrada de enzimas lisosómicas en el cerebro. El componente anatómico de la barrera hematoencefálica consiste en células endoteliales únicas en los capilares del cerebro, que tienen uniones estrechas sin fenestraciones y con pocas microvellosidades y pocas vesículas para el transporte de fluidos. Su componente fisiológico en parte consiste en enzimas únicas para el endotelio cerebral y de transporte activo a través de proteínas portadoras.

Más allá de la barrera hematoencefálica existen barreras adicionales. Los espacios perivascuales son patrullados por fagocitos que pueden secuestrar compuestos extraños, y además, capas de láminas basales, mallas macromoleculares de proteína se encuentran entre la vasculatura y el parénquima del sistema nervioso central. Después de esto, la glía lamintan, una envoltura formada por los pies finales de las astroglia y microglía forma otra barrera física. Finalmente, los solutos más allá de la barrera endotelial también están sujetos a un flujo de fluido a granel hacia afuera a través de espacios contiguos. El líquido intersticial del parénquima del sistema nervioso central se mueve parcialmente hacia el sistema ventricular y los espacios perivascuales y, posteriormente, los solutos se transportan a los espacios subaracnoideos a partir de los cuales los constituyentes solubles vuelven al torrente sanguíneo. Por lo tanto, existen múltiples barreras que limitan y regulan la entrada de elementos desde el torrente sanguíneo al cerebro.

Se ha contemplado que el problema de la barrera hematoencefálica se puede resolver con el desarrollo de la tecnología de fármacos direccionados al cerebro. Esta tecnología depende de la administración de proteínas terapéuticas al cerebro a través del acceso en sistemas de transporte endógeno localizados dentro del endotelio capilar del cerebro, que forma la barrera hematoencefálica in vivo.

Se administran en los siguientes ejemplos no limitantes de componentes con la capacidad de dirigirse o mediar el direccionamiento del sistema nervioso central y/o con una capacidad conocida para actuar como vehículos para el paso sobre la administración de la barrera hematoencefálica y/o las membranas celulares.

1) Péptidos y proteínas como vehículos para pasar LAMAN a las células diana mediante el paso sobre las membranas celulares y/o la BBB:

Un número de estudios en animales han demostrado que ciertas proteínas y/o péptidos pueden actuar como vehículos para atravesar la BBB. Por ejemplo, proteínas modificadas por el fragmento de insulina (Fukuta et al., *Pharmacol Res* 11:1681-1688) o anticuerpos para el receptor de transferrina (Friden et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4771-4775) pueden atravesar la barrera hematoencefálica. También se ha informado que las proteínas modificadas por acoplamiento a poliaminas (Poduslo and Curran, *J Neurochem* 66:1599-1606) pasan la barrera hematoencefálica. Además, los anticuerpos monoclonales peptidomiméticos (MAb) experimentan transcitosis mediada por receptor (RMT) a través de la BBB in vivo a través del transporte en el receptor endógeno de transferrina BBB (TfR) o receptor de insulina (IR). Las proteínas terapéuticas pueden conjugarse con los vectores de transporte MAb con tecnología de avidina-biotina o como proteínas de fusión.

2) Toxinas como vehículos para el paso de LAMAN a las células diana mediante el paso sobre las membranas celulares y/o la BBB:

Diferentes bacterias, plantas y animales producen toxinas. Las toxinas tienen muchos objetivos diferentes, como el intestino (enterotoxinas), los nervios o las sinapsis (neurotoxinas). Las toxinas pueden atravesar las membranas celulares mediante procesos mediados por el receptor y la realización de la presente invención es usar toxinas como vehículos para pasar rhLAMAN a las células diana sobre las membranas celulares y/o la BBB. Las células diana preferidas son células en el CNS y/o el sistema nervioso periférico. Debe entenderse que solo se usa la parte de la toxina que es responsable de la asociación con y de la translocación sobre las membranas celulares.

Un ejemplo de una toxina usada como vehículo es una toxina bacteriana tal como toxina diftérica (DT), de *Corynebacterium Diphtheriae*. Las toxinas bacterianas exhiben una amplia gama de toxicidades y se dividen en grupos por estructura y función. La toxina se enlaza a una célula diana y entra a la célula a través de un receptor, y se reduce a fragmentos separados. La toxina procesada se puede dividir en los siguientes 3 dominios: el dominio catalítico (C), el dominio del receptor (R) y el dominio de translocación (T).

El fragmento catalítico y el fragmento receptor de la toxina o sus fragmentos son reemplazados por LAMAN. Esta proteína de fusión puede atravesar las membranas celulares y/o la BBB y, por lo tanto, administrar el LAMAN a las células diana. Un ejemplo de la ingeniería de una molécula híbrida podría ser mediante tecnología recombinante.

5 Otros ejemplos de toxinas bacterianas que se usarán como vehículos son *Clostridium Botulinum*, exotoxina A de *Pseudomonas* producida por *Pseudomonas aeruginosa*, toxina de cólera producida por *Vibrio cholerae* y toxina pertussis producida por *Bordetella pertussis*.

10 Otros ejemplos de toxinas usadas como vehículos son toxinas vegetales seleccionadas de la lista de las siguientes toxinas vegetales: inhibidores de colinesterasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de amilasa, taninos, glucósidos cianogénicos, goitrógenos, proteínas de lectina y latirógenos, alcaloides de pirroizidina.

15 Sin embargo, otros ejemplos de toxinas usadas como vehículo son toxinas de mariscos (saxitoxina) y serpientes (alfa-bungarotoxina). La persona experimentada puede agregar ejemplos adicionales a la luz de los detalles y las características de la invención.

3) Proteínas y/o péptidos aislados de bacterias o virus como vehículos para el paso de rhLAMAN a las células diana mediante el paso sobre las membranas celulares y/o la BBB:

20 El elemento de transacción y/o la proteína de transacción de bacterias o virus se puede usar junto con rhLAMAN para cruzar la BBB y/o las membranas celulares.

25 Se seleccionan ejemplos de bacterias de la siguiente lista: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Proteus*, especies de *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neurospora*, espiroquetas *Borrelia burgdorferi* de *Ixodes ricinus*.

30 Los ejemplos de virus se seleccionan de la siguiente lista de familias de virus: *Parvoviridae*, *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Arenaviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae*. Ejemplos relevantes de virus seleccionados de la lista mencionada anteriormente son, por ejemplo, virus del sarampión, virus Papova y virus JC.

4) Sistemas de administración mediados por células

35 Una metodología de la terapia mediada por células puede abordar los trastornos de almacenamiento en más de una forma fundamental. El primero es reemplazar o compensar las poblaciones de células defectuosas con equivalentes normales. Una segunda forma de obtener beneficio terapéutico puede ser a través de la corrección cruzada. Los tipos de células apropiados ofrecen la capacidad no solo de cruzar la barrera endotelial desde la sangre sino también de migrar activamente hacia el parénquima y establecer su residencia entre el ambiente de las células enfermas. La célula humana preferida se selecciona de monocitos humanos, fibroblastos humanos y linfocitos humanos.

5) Perturbar la barrera hematoencefálica

45 Otra estrategia invasiva para la administración mejorada de fármacos en el CNS implica la administración sistémica de fármacos junto con la interrupción transitoria de la BBB (BBBD). Teóricamente, con la BBB debilitada, los fármacos administrados sistémicamente pueden experimentar tasas de extravasación mejoradas en el endotelio cerebral, lo que lleva a un aumento de las concentraciones parenquimatosas de fármaco. Se han investigado una diversidad de técnicas que alteran transitoriamente el BBB; sin embargo, aunque fisiológicamente interesante, muchos son inaceptablemente tóxicos y, por lo tanto, no son clínicamente útiles. Estos incluyen la infusión de disolventes tales como dimetilsulfóxido o etanol y metales tales como aluminio; irradiación X; y la inducción de condiciones patológicas que incluyen hipertensión, hipercapnia, hipoxia o isquemia.

50 Una técnica algo más segura implica la administración sistémica del fármaco convulsivo, metrazol, que aumenta transitoriamente la permeabilidad de la BBB al tiempo que provoca convulsiones. La administración concurrente del pentobarbital anticonvulsivo bloquea las convulsiones al tiempo que permite que persista el BBBD. La BBB también puede verse comprometida por la administración sistémica de varios agentes antineoplásicos, incluidos VP-16, cisplatino, hidroxilurea, flurouracilo y etopósido.

Interrupción osmótica de la barrera hematoencefálica

60 La inyección intracarotídea de una solución hipertónica inerte tal como manitol o arabinosa se ha empleado para iniciar el encogimiento de las células endoteliales y la apertura de uniones estrechas de BBB durante un período de unas pocas horas, y esto permite el suministro de agentes antineoplásicos al cerebro. La perturbación osmótica se ha probado como una estrategia para la administración de fármacos macromoleculares, como anticuerpos monoclonales, nanopartículas y virus. Sin embargo, el procedimiento descompone el mecanismo de autodefensa del cerebro y lo hace vulnerable al daño o la infección de todos los productos químicos o toxinas circulantes. Los

factores de riesgo incluyen, el paso de proteínas plasmáticas, la absorción alterada de glucosa, la expresión de proteínas de choque térmico, microembolismo o función neuronal anormal. Si bien se ha desarrollado una gran cantidad de técnicas para facilitar el suministro de compuestos sobre la barrera hematoencefálica, muchas de ellas muestran un éxito limitado al abordar las otras barreras mencionadas anteriormente. Su aplicabilidad en el tratamiento de la alfa-manosidosis parece, por lo tanto, limitada.

Por el contrario, un aspecto muy importante de la invención sin embargo, se refiere a un esquema para la reducción de la acumulación intralisosómica de oligosacáridos neutros ricos en manosa dentro del sistema nervioso central con base en una técnica que no depende de medios para facilitar el transporte a través de y/o penetrar y/o romper la barrera hematoencefálica. En realizaciones preferidas de la invención, por lo tanto, se descarta lo descrito anteriormente para acceder al sistema nervioso central. En una realización preferida de la invención, el medicamento de acuerdo con la invención no comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse o mediar el direccionamiento de células dentro del sistema nervioso central y/o un componente con una capacidad conocida para actuar como vehículo para el paso sobre la barrera hematoencefálica.

Expresado en términos más exactos, dicho medicamento o formulación no comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse a las células neuronales y/o gliales del cerebro.

Las realizaciones preferidas pertenecen por lo tanto al uso de alfa-manosidasa lisosómica, en el que dicho medicamento no comprende alfa-manosidasa lisosómica en una forma, que es capaz de atravesar la barrera del sistema nervioso central/hematoencefálica. Por consiguiente, también se prefiere que la alfa-manosidasa lisosómica no se haya modificado para obtener un transporte mediado por portador a través de la barrera hematoencefálica y que la alfa-manosidasa lisosómica no se haya formulado para obtener la alteración de la barrera hematoencefálica.

En realizaciones igualmente preferidas, el medicamento comprende una alfa-manosidasa lisosómica y no comprende

- a) un vehículo o vector, como un péptido o polipéptido, para la administración de alfa-manosidasa lisosómica en el sistema nervioso central, y
- b) un componente con una capacidad conocida para causar la apertura o la interrupción de la barrera hematoencefálica, y
- c) una célula intacta

Más específicamente, es un objeto de la presente invención proporcionar el uso de una alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento, en el que dicho medicamento no comprende un vehículo seleccionado del grupo que consiste en péptidos y proteínas exógenos, incluido el fragmento de insulina y péptidos y proteínas derivadas de virus o bacterias, poliaminas, unidades estructurales lipófilas que incluyen fosfolípidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como anticuerpos y toxinas del receptor de transferrina.

Además, la invención se refiere al uso de alfa-manosidasa lisosómica en la que dicha preparación de un medicamento no comprende la modificación de dicha alfa-manosidasa lisosómica mediante la unión de poliaminas.

El medicamento de acuerdo con la invención puede comprender o consistir en una alfa-manosidasa lisosómica, que se formula en una solución isotónica. El término "solución isotónica" se refiere convencionalmente a una solución que tiene la misma presión osmótica que la sangre. En el contexto de la presente invención, la solución puede ser, pero no se limita a, una solución isotónica humana. Actualmente se prefieren reguladores de formulación que comprendan o consistan en Na_2HPO_4 3,10-3,50 mM, NaH_2PO_4 0,4-0,6 mM, glicina 25-30 mM, manitol 220-250 mM, y agua para inyección. Igualmente preferidos son los reguladores de formulación que comprenden o consisten en citrato de sodio 4,0-5,0 mM, ácido cítrico 0,3-0,8 mM, manitol 200-250 mM, Tween 80 3,0-5,0 mM y agua para inyección. Alternativamente, la alfa-manosidasa lisosómica puede formularse en solución salina regulada con fosfato (regulador de fosfato 0,01 M + NaCl 0,145 M, pH=7,2).

Como se mencionó anteriormente, el uso de células intactas puede proporcionar medios para la administración de sustancias a través de la barrera hematoencefálica. La presente invención, sin embargo, se relaciona con un medicamento que no comprende una célula intacta.

Por consiguiente, una realización preferida adicional de la invención se refiere al uso de alfa-manosidasa lisosómica, en el que dicha preparación de un medicamento no implica el uso de un sistema de administración mediado por células. En particular, la presente invención no depende del uso de una célula intacta seleccionada del grupo que consiste en una célula autóloga transducida, tal como un fibroblasto transducido o un linfocito de sangre periférica y una línea celular encapsulada por polímeros capaz de secretar alfa-manosidasa en el fluido cerebroespinal.

Es de esperar que la administración de alfa-manosidasa lisosómica produzca una acumulación disminuida de oligosacáridos neutros en una gran variedad de células dentro del sistema nervioso central. En realizaciones preferidas de la invención, sin embargo, dichas células dentro de una o más regiones del sistema nervioso central comprenden células neuronales y/o células gliales. Además, dichas células pueden comprender células extraneurales presentes dentro del sistema nervioso central.

El cerebro comprende cuatro partes principales, el cerebro, el diencefalo, el tallo cerebral y el cerebelo. Debe entenderse que la administración de alfa-manosidasa afecta al almacenamiento de oligosacáridos en una o más de estas partes. En realizaciones preferidas adicionales de la invención, dichas una o más regiones, del sistema nervioso central comprende una o más regiones dentro del cerebro, diencefalo, tallo cerebral y/o cerebelo.

Es probable que la reducción en la acumulación de oligosacáridos ricos en manosa neutros dentro de ciertas regiones específicas de las cuatro partes del cerebro mencionadas anteriormente sea de particular relevancia con respecto a la reducción de las manifestaciones clínicas de la alfa-manosidosis. En realizaciones más particulares de la invención, la acumulación de oligosacáridos se reduce dentro de una o más regiones dentro del cerebro siendo seleccionado del grupo que comprende una o más regiones dentro de la corteza cerebral, una o más regiones dentro de los núcleos subcorticales y una o más regiones dentro del sistema límbico

Se han atribuido varias funciones sensoriales y/o motoras a diversas regiones específicas dentro de la corteza cerebral. Dentro del lóbulo frontal, que generalmente es de función motriz, el giro precentral (corteza motora primaria) es responsable del control del movimiento fino, la corteza motora de asociación es responsable de la integración de información para movimientos complejos, la corteza motora de lenguaje está involucrada en producción de habla; (área de Broca), y la corteza prefrontal está involucrada en la toma de decisiones; dirección de atención.

Dentro del lóbulo parietal, que generalmente es sensorial en su función, el giro postcentral (corteza somatosensorial primaria) está involucrada en la percepción de la sensación de la piel (cutánea) y muscular (propioceptiva), la corteza de asociación sensorial participa en la integración de las señales sensoriales; dirección de la atención sensorial, la corteza izquierda de asociación está involucrada en la producción de significado para el lenguaje; (área de Wernicke), y la corteza derecha de asociación está involucrada en la producción de significado para las relaciones espaciales.

Dentro del lóbulo occipital, que generalmente tiene una función sensorial, la corteza visual está involucrada en la percepción de la sensación visual. La corteza de asociación visual está involucrada en la percepción del contenido visual y su significado.

Dentro del lóbulo temporal, que generalmente es de función sensorial, la corteza auditiva primaria está involucrada en la percepción de la sensación auditiva, la corteza de asociación auditiva está involucrada en la percepción del contenido y significado auditivo; se extiende a la corteza parietal, corteza gustativa y olfatoria, que están involucradas en la percepción de la sensación gustativa y olfativa. La corteza insular ubicada en la profundidad del surco lateral está involucrada en proporcionar conocimiento sobre el resultado de los eventos.

Otras regiones incluyen el giro parahipocampal, que se superpone al hipocampo; el hipocampo, que está involucrado en la formación de la memoria a largo plazo y la amígdala, que está involucrada con la sensación de emoción.

En realizaciones aún más particulares de la invención, los niveles de oligosacáridos se reducen en una o más regiones dentro de la corteza cerebral que se seleccionan del grupo que comprende el lóbulo frontal, el lóbulo parietal, el lóbulo temporal y el lóbulo occipital.

En otras realizaciones particulares de la invención, los niveles de oligosacáridos se reducen en una o más regiones dentro del diencefalo que se seleccionan del grupo que comprende el tálamo y el hipotálamo.

El tálamo es un componente del diencefalo enterrado profundamente dentro del núcleo del cerebro. Conectado rica y recíprocamente con las estructuras corticales, los núcleos talámicos funcionan tanto para retransmitir como para modular la transmisión de información por todo el cerebro.

El tálamo comprende las siguientes partes principales: el grupo nuclear anterior, el grupo nuclear de la línea media, el núcleo dorsal medial, el grupo nuclear intralaminar, el grupo nuclear lateral, el grupo nuclear ventral, los cuerpos geniculados, el complejo nuclear posterior, el núcleo reticular talámico, los tractos de fibra talámicos y el stratum zonale del tálamo.

El sistema límbico es un grupo de estructuras cerebrales que están involucradas en diversas emociones, como la agresión, el miedo, el placer y también en la formación de la memoria. El sistema límbico también afecta el sistema endocrino y el sistema nervioso autónomo. Consiste en varias estructuras ubicadas alrededor del tálamo, justo debajo del cerebro: el hipocampo, que está involucrado en la formación de la memoria a largo plazo, la amígdala, que está involucrada en la agresión y el miedo, el giro cingulado, el giro fornicado, la arquicorteza y el hipotálamo, que controla el sistema nervioso autónomo y regula la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el hambre, la sed y la excitación sexual. Conectado a la glándula pituitaria y por lo tanto regula el sistema endocrino.

Las funciones neurológicas ubicadas en el tallo cerebral incluyen las necesarias para la supervivencia (respiración, digestión, frecuencia cardíaca, presión sanguínea) y para la excitación (estar despierto y alerta). La mayoría de los

nervios craneales provienen del tallo cerebral. El tallo cerebral es la vía para todos los tractos de fibras que pasan desde los nervios periféricos y la médula espinal hasta las partes más altas del cerebro. En realizaciones particulares adicionales de la invención, los niveles de oligosacáridos se reducen en una o más regiones dentro del tallo cerebral que se seleccionan del grupo que comprende el mesencéfalo, el pons y la médula oblongada.

La médula oblongada funciona principalmente como una estación amplificadora para el cruce de tractos motores entre la médula espinal y el cerebro. También contiene los centros respiratorio, vasomotor y cardíaco, así como muchos mecanismos para controlar las actividades reflejas, como tos, arcadas, deglución y vómito. El mesencéfalo sirve como vía nerviosa de los hemisferios cerebrales y contiene centros de reflejo auditivos y visuales. El pons es una estructura tipo puente, que conecta diferentes partes del cerebro y sirve como una estación amplificadora desde la médula hasta las estructuras corticales superiores del cerebro. Contiene el centro respiratorio.

La función del cerebelo, que incluye la corteza cerebelosa, es facilitar la realización de movimientos mediante la coordinación de la acción de los diversos grupos musculares participantes. En otras realizaciones particulares de la invención, los niveles de oligosacáridos se reducen en una o más regiones dentro del cerebelo que comprende la corteza cerebelosa.

Una ventaja principal del uso de alfa-manosidasa lisosómica recombinante de acuerdo con la presente invención se relaciona con el hecho de que los efectos del tratamiento visto en el cerebro pueden combinarse con efectos en células que no son parte del sistema nervioso central. Por lo tanto, es probable que la administración de alfa-manosidasa lisosómica exógena corrija la mayoría, si no todas, las manifestaciones clínicas de la alfa-manosidosis. En realizaciones preferidas, la invención se refiere por lo tanto al uso de un medicamento que reduce adicionalmente los niveles de oligosacáridos ricos en manosa neutros en células de tejidos neurológicos, que no están dentro del sistema nervioso central. En esta realización de la invención, dicho medicamento comprende además un componente, que es capaz de dirigirse a células de tejidos neurológicos, que no están dentro del sistema nervioso central. En particular, el uso de este medicamento da como resultado la corrección del almacenamiento lisosómico en las células, que no están dentro del sistema nervioso central, que comprende las células más prominentes del sistema nervioso periférico. Estos comprenden células neuronales y/o células de Schwann.

Las manifestaciones clínicas de la alfa-manosidosis pueden aliviarse en parte por los efectos aislados de la sustitución de la alfa-manosidasa deficiente en los tejidos viscerales. Sin embargo, una parte central del concepto, que constituye la base de la presente invención, se relaciona con el hecho de que los efectos beneficiosos de la terapia sobre el almacenamiento lisosómico en el sistema nervioso central son secundarios y/o dependen de una reducción en el almacenamiento lisosómico en tejidos fuera del sistema nervioso central. Por consiguiente, es una característica importante de la invención que dicho medicamento también se use para obtener una reducción en los niveles de oligosacáridos ricos en manosa neutros en células dentro de tejidos no neurológicos y que el medicamento comprenda un componente capaz de direccionar a células dentro de tales tejidos.

En este contexto, se cree que los efectos de la alfa-manosidasa exógena en los tejidos viscerales son de importancia primaria. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el medicamento por lo tanto comprende un componente, que es capaz de dirigir células de tejidos neurológicos y/o no neurológicos fuera del sistema nervioso central. En una realización aún más preferida, dichos tejidos neurológicos y/o no neurológicos fuera del sistema nervioso central comprenden tejidos viscerales seleccionados del grupo que comprende hígado, bazo, riñón y corazón.

Está implicado que la alfa-manosidasa exógena puede administrarse a células diana en tejidos relevantes fuera del sistema nervioso central mediante el uso de, por ejemplo, endocitosis mediada por receptor. Preferiblemente, la alfa-manosidasa se administra sobre membranas celulares de tales células diana, aprovechando la absorción mediada por manosa o receptor de manosa-P-6. De acuerdo con esto, el factor mencionado anteriormente que posee capacidades de direccionamiento es preferiblemente manosa-6-fosfato.

Se contempla que cualquier alfa-manosidasa de mamífero puede usarse para reemplazar la enzima deficiente en un sujeto. Sin embargo, cuando el sujeto es un humano, se preferirá el uso de una alfa-manosidasa lisosómica humana para, por ejemplo, minimizar la aparición de reacciones antigénicas. Por consiguiente, las realizaciones preferidas de la invención se refieren al uso de una alfa manosidasa lisosómica, que es una alfa manosidasa lisosómica humana.

En una realización más preferida, la alfa manosidasa lisosómica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Por razones prácticas y económicas, se prefiere que la alfa-manosidasa se produzca de manera recombinante. Además, es de esperar que para una hidrolasa lisosómica purificada a partir de tejido, la enzima tenga un bajo contenido de manosa-6-fosfato. Por lo tanto, mediante producción recombinante también será posible obtener una preparación de la enzima en la que una fracción grande contiene manosa-6-fosfato. La producción recombinante puede lograrse después de la transfección de una célula usando una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

La alfa-manosidasa se prepara preferiblemente en un sistema de células de mamífero con el fin de proporcionar un perfil de glicosilación, que asegura una absorción eficiente mediada por receptor en células de, por ejemplo, órganos viscerales del cuerpo. En particular, se ha encontrado que la producción de la enzima en células CHO, COS o BHK asegura una modificación postraducciona adecuada de la enzima mediante la adición de residuos de manosa-6-fosfato. Además, se obtiene un perfil de sialilación correcto. Se sabe que la sialilación correcta es importante para evitar la absorción hepática debido a los residuos de galactosa expuestos.

En realizaciones aún más preferidas, el sistema de células de mamífero se selecciona, por lo tanto, del grupo que comprende CHO, células COS o células BHK (Stein et al. J Biol Chem.1989, 264, 1252-1259). Se puede preferir adicionalmente que el sistema de células de mamífero sea una línea celular de fibroblastos humanos.

En una realización más preferida, el sistema de células de mamífero es una línea celular CHO.

Resulta que realizaciones igualmente preferidas de la invención se refieren al uso de una preparación de alfa-manosidasa lisosómica en la que una fracción de dicha preparación consiste en alfa-manosidasa lisosómica que tiene uno o más oligosacáridos unidos a N que llevan grupos manosa-6-fosfato.

Se prefiere adicionalmente que una fracción de una preparación de dicha alfa-manosidasa lisosómica sea capaz de enlazarse a los receptores de manosa 6-fosfato.

La capacidad de la enzima para enlazarse a receptores de manosa-6-fosfato se puede determinar en un ensayo in vitro como se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud. Aquí, el enlace de la enzima a una matriz de afinidad 300 de MPR proporciona una medida de su capacidad para enlazarse a receptores de manosa-6-fosfato. En una realización preferida de la invención, el enlace de la enzima a receptores de manosa-6-fosfato ocurre in vitro.

En realizaciones más preferidas de la invención, esta fracción corresponde a desde 1 a 75% de la actividad de una preparación de alfa-manosidasa lisosómica, tal como desde 2 a 70%, tal como desde 5 a 60%, tal como desde 10 a 50% tal como desde 15 a 45%, tal como desde 20 a 40%, tal como desde 30 a 35%.

Por consiguiente, se prefiere que la alfa-manosidasa lisosómica tenga un contenido de residuos de manosa-6-fosfato que permita el enlace dependiente de manosa 6-fosfato de desde 2 a 100%, 5 a 95%, 10 a 90%, 20 a 80%, 30 a 70% o 40 a 60% de la cantidad de enzima a una matriz de receptor Man-6-P. En la actualidad, el grado de fosforilación se ha analizado en varios lotes de enzima y, típicamente, desde 30 al 45% de la enzima se fosforila y se enlaza a la matriz de afinidad.

Se prefiere además que una fracción constituida desde 2-100%, 5-90%, 10-80%, 20-75%, 30-70%, 35-65% o 40-60% de la cantidad de dicha alfa-manosidasa lisosómica se enlaza al receptor Man-6-P con alta afinidad. Teóricamente, dos grupos manosa 6-fosfato deben posicionarse cerca uno del otro para que la enzima se enlaze al receptor Man-6-P con alta afinidad. Recientes observaciones sugieren que la distancia entre los restos de manosa fosforilada debe ser de 40 Å o menos para obtener un enlace de alta afinidad. En la alfa-manosidasa lisosómica humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, los dos residuos de manosa 6-fosfato pueden estar situados en los residuos de asparaginas en las posiciones 367 y 766. Por consiguiente, se prefiere que el medicamento de acuerdo con la presente invención comprenda alfa-manosidasa lisosómica, una fracción de la cual lleva grupos manosa 6-fosfato en estos dos residuos de asparagina.

Debe entenderse que pueden emplearse diversos medios de administración para administrar la enzima. Estos incluyen inyecciones o infusiones parenterales, incluidas las intravenosas, intraarteriales, subcutáneas, intraperitoneales o intramusculares. Dado que es probable que la administración se repita de manera regular, se prefiere el uso de técnicas simples para la administración. En una realización actualmente más preferida de la invención, la alfa manosidasa se usa para la preparación de un medicamento, que es para administración intravenosa. En particular, se considera que la administración por inyección directamente en el sistema nervioso central no es adecuada ya que la administración a través de esta ruta no puede ser realizada por una persona no experimentada.

Por supuesto, será posible coadministrar el medicamento, que se prepara mediante el uso de la alfa-manosidasa de acuerdo con la invención con una composición que comprende un componente con una capacidad conocida para dirigir o mediar el direccionamiento del sistema nervioso central. En una realización muy preferida de la presente invención, dicha coadministración no es necesaria ni deseada y no debe incluirse en el esquema de tratamiento. Esta realización se refiere al uso de acuerdo con la invención, en el que dicho medicamento es para administración sin administración suplementaria de una composición que comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse al sistema nervioso central.

Parece que el medicamento debe administrarse en dosis, en las que la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica es suficiente para corregir los defectos en el almacenamiento lisosómico. Parece de acuerdo a estudios previos sobre trastornos lisosómicos relacionados, que puede no ser necesaria una sustitución completa de la enzima deficiente, de modo que se alcancen los niveles correspondientes a los observados en individuos sanos. Con el fin de

minimizar el coste de la terapia y posiblemente también reducir los posibles efectos adversos, el objetivo debe ser utilizar tan pequeñas cantidades de la enzima como sea posible. Además, parece posible "adaptar" el tratamiento, incluidas las cantidades administradas y la frecuencia de administración de acuerdo con el perfil del sujeto individual. Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la presente invención, el medicamento se administra en una cantidad, que está dentro del intervalo de 1 a 400 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal del sujeto a tratar, tal como dentro del intervalo de 2 a 350, 5 a 300, 7,5 a 200, 10 a 200, 15 a 150, 20 a 100, 25 a 75, 30 a 60, 35 a 50 o 40 a 45 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal,

En una realización actualmente más preferida de la invención, el medicamento se administra en una cantidad de 250 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal. En una realización igualmente preferida de la invención, el medicamento se administra en una cantidad de 50 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal.

La actividad específica de la alfa-manosidasa lisosómica puede ser un factor crucial que influye en la capacidad de la mencionada alfa-manosidasa lisosómica que tiene una actividad específica de 5-100 U/mg, tal como desde 10-90 U/mg, 15-80 U/mg, 20-70 U/mg, 25-65 U/mg, 30-60 U/mg o 35-55 U/mg.

En la preparación enzimática utilizada en la presente invención, una fracción de la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica está presente en forma de un dímero de 260 kDa compuesto de monómeros de 130 kDa de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, cuando se analiza bajo condiciones reductoras, una fracción variable de la cantidad de enzima parece haberse procesado en las formas de 70 y 55 kDa. Esto indica que una fracción de la cantidad de la alfa-manosidasa lisosómica se ha escindido parcialmente, pero todavía se mantiene unida en la forma de 260 kDa mediante puentes disulfuro. Tanto la forma de 130 kDa como las formas procesadas son activas, pero se prefiere que una gran fracción de la cantidad de enzima esté presente como dímeros de la forma precursora de 130 kDa cuando se administra al sujeto. Preferiblemente, al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% están presentes como un dímero de la forma de 130 kDa. Cuando la enzima se absorbe posteriormente en los lisosomas, se procesa en los péptidos de 15, 42 y 70 kDa. El péptido de 70 kDa se procesa adicionalmente para obtener tres péptidos más pequeños que aún se mantienen unidos mediante puentes disulfuro.

Como solo se espera que la terapia de reemplazo enzimático genere efectos transitorios, parece que el medicamento puede administrarse en una frecuencia que oscila desde varias inyecciones diarias hasta inyecciones una o dos veces por semana o por mes. En realizaciones preferidas, el medicamento puede administrarse en una frecuencia correspondiente a 1 a 5 inyecciones diarias, 1 a 5 inyecciones semanales, 1 a 5 inyecciones cada 2 semanas o 1 a 5 inyecciones cada mes. Alternativamente, la frecuencia puede corresponder a una inyección cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días.

En realizaciones igualmente preferidas, el medicamento se administra mediante inyección intravenosa repetida a diario, mediante inyección intravenosa repetida cada 2, 3, 4, 5 o 6 días, o mediante inyección intravenosa repetida semanal, quincenal o mensual.

En una realización actualmente preferida de la invención, la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica se administra una vez cada 3 a 4 días.

La administración del medicamento de acuerdo con la presente invención mediante inyección intravenosa conduce a solo incrementos insignificantes en la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica presente dentro del sistema nervioso central. Aunque no está limitado por esta teoría, parece que los niveles reducidos de oligosacáridos neutros pueden ser secundarios a y un resultado directo o indirecto del aumento de los niveles de enzima en el tejido periférico y los órganos viscerales. Dado que la alfa-manosidasa lisosómica parece eliminarse rápidamente de la circulación, parece crítico que las cantidades de enzima administradas sean tales que los niveles de enzima circulante permanezcan adecuadamente aumentados durante un período de tiempo que permita la absorción celular de cantidades apropiadas de enzima a través del receptor Man-6-P o, posiblemente, también a través de otros mecanismos de transporte actualmente desconocidos. Además, los niveles de enzima dentro de los órganos viscerales y el tejido periférico deben permanecer adecuadamente aumentados durante un tiempo suficiente para causar una reducción en las sulfátidas neutras no solo dentro de los órganos o tejidos sino también dentro del sistema nervioso central. En consecuencia, se prefiere que la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica administrada sea tal que:

- a) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en circulación durante no menos de 5-30 minutos, como no menos de 5, 10, 15, 20, 25 o 30 minutos, y/o
- b) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en los órganos viscerales, incluidos el riñón, el bazo y el corazón, por no menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 24 horas, y/o
- c) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en el hígado durante no menos de 6, 12 o 24 horas o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días,

después de la inyección, tal como inyección intravenosa, de dicho medicamento.

En el presente contexto, el término "niveles efectivos" se refiere a niveles de alfa-manosidasa lisosómica que se incrementan por al menos dos veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o al menos 50 veces en comparación con los niveles enzimáticos vistos en extractos de suero u órgano de sujetos no tratados cuando se analizaron en un ensayo enzimático como se describe en el ejemplo 2 de la presente solicitud.

Preferiblemente, la enzima una vez administrada a dicho sujeto conducirá a una reducción en los niveles de oligosacáridos intralisosómicos preferiblemente correspondientes a 20%, más preferiblemente 30%, incluso más preferiblemente 40%, aún más preferiblemente 50%, aún más preferiblemente 60%, más preferiblemente más del 70%.

En particular, la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica administrada es preferiblemente tal que:

a) la cantidad de oligosacáridos neutros en los órganos viscerales, incluidos el hígado, el bazo, el riñón y/o el corazón, se reduce en un 10-80%, 15-85%, 20-90%, 25-95% o 30-100%, como al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% por encima de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 o 24 horas, en comparación con los niveles previos al tratamiento o los niveles observados en sujetos no tratados, y/o

b) la cantidad de oligosacáridos neutros en los órganos viscerales, incluidos el hígado, el riñón, el bazo y/o el corazón, se reduce en un 40-80%, 45-85%, 50-90%, 55-95% o 60-100%, por lo menos por 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% durante un período de 1-4, 2-6 o 4-8 días, y/o

c) el almacenamiento de oligosacáridos neutros en el hígado se reduce durante un período de 1 a 12, 2-10 o 4-8 días determinado por una menor presencia de vacuolas de almacenamiento dentro de las células endoteliales sinusales, las células de Kupffer y los hepatocitos

después de la inyección, tal como inyección intravenosa, de dicho medicamento.

Es fundamental para la presente invención la observación de que una reducción en los niveles de oligosacáridos neutros en el sistema nervioso central solo se observa después de la administración repetida de alfa-manosidasa lisosómica. Por lo tanto, puede preferirse que la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica administrada sea tal que:

a) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en circulación, y/o

b) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en los órganos viscerales, incluidos el riñón, el bazo y el corazón, y/o

c) los niveles efectivos de la enzima se mantienen en el hígado,

mediante inyección repetida, tal como inyección intravenosa, del medicamento diariamente, mediante inyección repetida, tal como inyección intravenosa, cada 2, 3, 4, 5 o 6 días, o mediante inyección repetida, tal como inyección intravenosa, de manera semanal, quincenal o mensual.

También puede preferirse que la cantidad de alfa-manosidasa lisosómica administrada sea tal que

a) el almacenamiento de oligosacáridos neutros en riñón y corazón se ha corregido por completo o se ha corregido por completo al menos durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, y/o

b) la cantidad de oligosacáridos neutros en el bazo se reduce al menos en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, o al menos reducido durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, y/o

c) el almacenamiento de oligosacáridos neutros en el hígado y el riñón se reduce o se reduce en un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días como se determina por una presencia reducida de vacuolas de almacenamiento dentro de las células endoteliales sinusales, las células de Kupffer y los hepatocitos del hígado y en el epitelio tubular del riñón

mediante inyección repetida, tal como inyección intravenosa, del medicamento diariamente, mediante inyección repetida, tal como inyección intravenosa, cada 2, 3, 4, 5 o 6 días, o mediante inyección repetida, tal como inyección intravenosa, de manera semanal, quincenal o mensual.

La reducción de los oligosacáridos almacenados en el cerebro puede resultar, al menos en parte, de la eliminación del material de almacenamiento del endotelio cerebral y de las meninges, lo que puede mejorar la microcirculación y el flujo del fluido cerebroespinal. Una realización muy preferida de la presente invención se refiere por lo tanto al uso de alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento para reducir los niveles intracelulares de oligosacáridos neutros ricos en manosa, en células dentro de una o más regiones del endotelio cerebral y/o las meninges.

Debe entenderse que el medicamento puede tener las características descritas anteriormente. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, dicho medicamento no comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse o mediar el direccionamiento del sistema nervioso central y/o un componente con una capacidad conocida para actuar como vehículo para atravesar la barrera hematoencefálica.

De nuevo, se prefiere que el método comprenda administrar dicho medicamento de alfa-manosidasa por una vía diferente a la administración intracerebroventricular, espinal, intratecal o intracraneal.

Particularmente preferida es la administración del medicamento por inyección intravenosa o subcutánea.

La coadministración del medicamento de acuerdo con la presente invención con un componente con una capacidad conocida para dirigirse o mediar el direccionamiento del sistema nervioso central y/o un componente con una capacidad conocida para actuar como vehículo para el paso sobre la barrera hematoencefálica no es necesario ni deseado y no debe incluirse en el esquema de tratamiento. Por lo tanto, se prefiere que la administración de dicho medicamento no se complemente con la administración de una composición que comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse al sistema nervioso central.

De acuerdo con una publicación reciente, la inyección intratecal, que se inyecta directamente en el líquido cefalorraquídeo) de la alfa-L-iduronidasa humana recombinante (rhIDU) puede reducir el almacenamiento de carbohidrato en el tejido cerebral en un modelo canino de mucopolisacaridosis (MPL) (Kakkis, 2003). Aunque la administración intravenosa del medicamento de acuerdo con la presente invención se prefiere marcadamente, las observaciones de Kakkis sugieren que dicha administración puede al menos en algunos casos combinarse con otros tratamientos, que incluyen otras rutas de administración.

La invención puede proporcionar así el uso de una alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento para administración intravenosa así como para administración por inyección intratecal o espinal, en la que la administración intravenosa e intratecal combinada da como resultado una reducción en los niveles de galactosil sulfatida en células diana dentro del sistema nervioso periférico y en células diana dentro del sistema nervioso central en un sujeto.

Además, la invención puede proporcionar el uso de una alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento para administración intravenosa, donde la administración intravenosa del medicamento da como resultado una reducción en los niveles de galactosil sulfatida en células diana dentro del sistema nervioso periférico y en células diana dentro del sistema nervioso central.

En otro aspecto más, se proporciona un método para la preparación de alfa-manosidasa humana recombinante, comprendiendo el método a) introducir, en un vector adecuado, un fragmento de ácido nucleico que comprende un fragmento de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; b) transformar una célula con el vector obtenido en el paso a);

c) cultivar la célula huésped transformada bajo condiciones que faciliten la expresión de la secuencia de ácido nucleico; d) recuperar el producto de expresión del cultivo. El método puede comprender además una serie de una o más etapas de purificación.

En particular, se proporciona un método, en el que el fragmento de ácido nucleico comprende el fragmento de 3.066 pares de bases EcoRI-XbaI del fragmento de ADN que se muestra en la SEQ ID NO 2.

La producción de alfa-manosidasa recombinante, que es manosa-6-P, comprende uno o varios o todos los siguientes pasos generales (un esbozo):

A. Síntesis de rhLAMAN

Clonación de rhLAMAN específico

B. Transfección

Se usan 2-10 µg de ADN del vector híbrido rhLAMAN para la transfección mediante la metodología de precipitados de fosfato/choque de glicerol, en células de mamíferos (por ejemplo, células CHO, COS o células BHK). La transfección también se puede hacer con una metodología de choque eléctrico.

C. Expresión de rhLAMAN

La síntesis de la proteína activa y la modificación de manosa-6-P de dicha proteína se realiza durante la expresión en el sistema de células de mamífero.

D. Purificación de rhLAMAN

la alfa-manosidasa humana recombinante se purifica usando un procedimiento de 6 etapas; ver el ejemplo 1.

E. Sistema de prueba para la absorción mediada por el receptor de manosa-6-P

La capacidad de la alfa-manosidasa recombinante producida para ser activa en una absorción mediada por el receptor manosa-6-P se prueba incubando alfa-manosidasa con fibroblastos normales o fibroblastos de pacientes con alfa-manosidosis. La absorción en las células se ensaya mediante una actividad aumentada de alfa-manosidasa.

En una realización actualmente preferida, la alfa-manosidasa se produce en un sistema celular de mamífero seleccionado del grupo que comprende células BHK, COS y CHO. Uno de los parámetros críticos del método es el perfil de glucosilación de la alfa-manosidasa en la preparación final. El perfil de glucosilación es un determinante principal de la actividad correctora de la enzima in vivo a través de sus efectos sobre la endocitosis mediada por receptor y el aclaramiento de la enzima de la corriente sanguínea. Cuando se usan los sistemas celulares de mamífero preferidos mencionados anteriormente, se ha encontrado que se produce alfa-manosidosis con un perfil de glucosilación apropiado; en particular, el uso de células CHO conduce a la producción de alfa-manosidasa con un contenido adecuado de manosa-6-fosfato. En los ejemplos de la presente solicitud, la capacidad de la alfa-manosidasa para enlazarse a una columna MPR 300 proporciona una medida de su contenido de manosa-6-fosfato. La alfa-manosidasa que contiene manosa-6-fosfato se secreta en el medio y la purificación de la enzima se puede facilitar mediante el uso de sales de amonio (NH_4Cl) en la etapa de fermentación.

Actualmente, un factor que debe tenerse en cuenta al aislar y purificar la enzima, es la ocurrencia de desfosforilación durante el aislamiento. Mientras que se ha obtenido la preparación de alfa-manosidasa humana en la que una fracción correspondiente al 40% o más de la actividad de la enzima fue capaz de enlazarse a la columna MPR 300, esta fracción puede ser tan baja como un pequeño porcentaje. Para reducir la desfosforilación durante las etapas de procesamiento, la presencia de uno o más inhibidores de la fosfatasa parece crucial. Tales inhibidores de fosfatasa están disponibles a partir de fuentes comerciales.

Un aspecto importante de la invención se relaciona con el uso de una alfa-manosidasa recombinante para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alfa-manosidosis. En particular, se prefiere que la alfa-manosidasa sea una alfa-manosidasa humana recombinante.

La enfermedad, que es el objetivo para el método de la invención es la alfa-manosidosis, y por lo tanto el catalizador es alfa-manosidasa o una parte enzimáticamente equivalente o análogo de la misma. Lo más preferido es que el catalizador sea una forma recombinante de la enzima alfa-manosidasa humana o de la parte enzimáticamente equivalente o análogo de la misma, ya que la producción recombinante permitirá la producción a gran escala que, con los medios disponibles actualmente, no parece viable si la enzima debería purificarse de una fuente nativa.

Preferiblemente, la alfa-manosidosis se realiza mediante técnicas recombinantes. En una realización adicional, la alfa-manosidosis es una alfa-manosidasa humana (hLAMAN) y aún más preferida humana madura (mhLAMAN) o un fragmento de la misma. El fragmento puede modificarse, sin embargo, los sitios activos de la enzima deben conservarse.

Es de esperar que, en las preparaciones de alfa-manosidosis de acuerdo con la presente invención, una fracción de la enzima esté representada por su forma precursora, mientras que otras fracciones representen las formas proteolíticamente procesadas de aproximadamente 55 y 70 kDa. En general, la célula diana es una célula en la que la actividad enzimática, tal como la actividad alfa-manosidasa es insuficiente para la función óptima de la célula. La actividad insuficiente de la alfa-manosidasa puede medirse por uno o más de los parámetros seleccionados a partir del monitoreo de niveles de oligosacáridos ricos en manosa en la orina, análisis de la actividad de la alfa-manosidasa en material de un sujeto como leucocitos y/o fibroblastos de la piel, presencia de síntomas clínicos o aumento en la rata de desarrollo de síntomas clínicos de alfa-manosidosis.

Una característica significativa de la actividad insuficiente de alfa-manosidasa es una célula en la que está presente una acumulación intracelular masiva de oligosacáridos ricos en manosa. Naturalmente, dicha célula es una célula diana de acuerdo con la presente invención. La célula diana también puede ser una célula del sistema nervioso. Además, las células diana para administrar la enzima también incluyen uno o más tipos de células seleccionadas de monocitos humanos, fibroblastos humanos, linfocitos humanos, macrófagos humanos.

Se puede usar una actividad incrementada de la alfa-manosidasa como un parámetro para evaluar el éxito de un programa de tratamiento. La actividad se mide por uno o más de los parámetros seleccionados de monitorear niveles aumentados de oligosacáridos ricos en manosa en orina, análisis de actividad de alfa-manosidasa en material del paciente, como en leucocitos y/o en fibroblastos de piel, presencia de síntomas clínicos o aumento en la rata de desarrollo de síntomas clínicos de alfa-manosidosis.

Es un aspecto muy importante de la invención realizar el tratamiento de un posible defecto enzimático prenatalmente. En un aspecto adicional de la invención, la membrana celular es la barrera fetal-materna (placenta). Como es el caso para la barrera hematoencefálica, puede ser una característica importante de la presente invención

que la administración real de la enzima sobre la barrera fetal-materna o la interrupción de la barrera fetal-materna sea innecesaria e indeseada.

Con respecto a la descripción anterior de los diversos aspectos de la presente invención y de las realizaciones específicas de estos aspectos, debe entenderse que cualquier distintivo y característica descrita o mencionada anteriormente en relación con un aspecto y/o una realización de un aspecto de la invención también se aplica por analogía a cualquiera o todos los otros aspectos y/o realizaciones de la invención descrita.

Cuando, en la presente solicitud, se hace referencia en singular a un objeto de acuerdo con la presente invención o a uno de sus distintivos o características, esto también se refiere al objeto o sus distintivos o características en plural. Como un ejemplo, cuando se hace referencia a "una célula" debe entenderse que se refiere a una o más células.

A lo largo de la presente especificación, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento declarado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Patrón de polipéptido de LAMAN bovino, de ratón y humano

Se separaron 10 µg de LAMAN purificado de riñón bovino o las secreciones de células que sobreexpresan LAMAN de ratón o humano mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Los polipéptidos de 130 kDa vistos en LAMAN de ratón y humano corresponden a los precursores y los polipéptidos que oscilan desde 11 a 70 kDa a formas procesadas proteolíticamente de LAMAN. El polipéptido de 46-48 kDa en LAMAN bovino representa intermedios parcialmente procesados.

Figura 2: Cromatografía en capa fina de oligosacáridos neutros en hígado, bazo, riñón y corazón.

La fracción de oligosacáridos neutros de cantidades iguales de tejidos se separó mediante cromatografía en capa fina. El carril 1 contiene la muestra de ratones de control, el carril 2 de ratones con inyección simulada de LAMAN, el carril 3, 4 y 5 las muestras de ratones con α-manosidosis inyectados con 100 mU de LAMAN de ratón por g de peso corporal y sacrificados después de 2, 4 y 10 horas, respectivamente (ver también la Tabla 1). Los oligosacáridos se detectaron con orcinol/ácido sulfúrico. La espectrometría de masas y la sensibilidad a α-manosidasa de haba borriquita demostraron que los oligosacáridos M2 a M9 contienen 2 a 9 residuos de manosa y un único residuo de N-acetilglucosamina en el terminal reductor. Los oligosacáridos se cuantificaron por densitometría. Para el cálculo del almacenamiento, los valores de oligosacáridos neutros en ratones con α-manosidosis se corrigieron para los oligosacáridos neutros en ratones de control y se expresaron como porcentaje de esto en los ratones con α-manosidosis con inyección simulada. El almacenamiento en ratones con α-manosidosis inyectados con LAMAN se expresó como porcentaje de ese en ratones con α-manosidosis con inyección simulada. La espectrometría de masas y la sensibilidad a α-manosidasa de haba borriquita mostraron que los oligosacáridos M2 a M9 contienen 2 a 9 residuos de manosa y un único residuo de N-acetilglucosamina en el terminal reductor.

Figura 3: oligosacáridos neutros en extractos tisulares de ratones con α-manosidosis inyectados con 100 mU de LAMAN de ratón por g de peso corporal.

Los ratones se sacrificaron 4, 8 y 16 días después de la inyección y los oligosacáridos neutros en extractos de hígado, bazo, riñón y corazón se cuantificaron por densitometría después de la separación mediante cromatografía de capa fina (véase la leyenda de la Figura 2).

Figura 4: eliminación de LAMAN del suero

Se inyectó LAMAN de origen bovino (□), de ratón (■) o humano (○), 50 mU/g de peso corporal, en la vena de la cola de ratones con α-manosidosis de 8 semanas de edad. Se recolectó sangre del plexo retroorbital 5 a 65 minutos después de la inyección. Cada valor representa la media de dos animales. El intervalo está indicado por barras donde excede el tamaño de los símbolos.

Figura 5: Efecto corrector de LAMAN bovino, de ratón y humano en el almacenamiento de oligosacáridos neutros

Los ratones recibieron 50 mU de LAMAN por g de peso corporal (ver Figura 3) 2 días antes del análisis del tejido. Los oligosacáridos neutros se cuantificaron como en las Figuras 2 y 3. Las barras indican el intervalo observado en dos ratones independientes.

Figura 6: oligosacáridos neutros en extractos tisulares de ratones con α-manosidosis después de la inyección de una dosis única de 250 mU de α-manosidasa humana por g de peso corporal.

Los ratones se sacrificaron 1, 3, 6 y 12 días después de la inyección. Los oligosacáridos neutros en los extractos de tejido de hígado, bazo, riñón y corazón se cuantificaron mediante cromatografía en capa fina y densitometría como en las Figuras 1 y 2.

5 Figura 7: Desaparición y reaparición de vacuolas de almacenamiento en hígado

A, C, E, microscopía óptica (secciones de semitina); B, D, F, ultraestructura de las células de Kupffer; A, B, ratón con α -manosidosis con inyección simulada (14 semanas de edad). Los hepatocitos muestran vacuolas claras a lo largo de los canalículos biliares (A, flechas). Las células de la pared sinusal fuertemente vacuoladas no se distinguen claramente a nivel del microscopio óptico (A) debido a los puentes del citoplasma extremadamente estrechos entre las vacuolas como se ve en (B). Ratón C, D, con α -manosidosis, 1 día después de la inyección de 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal. Las vacuolas han desaparecido de los hepatocitos (C). Se ven muy pocas células de la pared sinusal vacuoladas (C, flecha). Las vacuolas en las células de Kupffer son más pequeñas que en el animal tratado de manera simulada y pueden contener una matriz de electrones densa (D). Ratón E, F, con α -manosidosis, 12 días después de la inyección de 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal. Las vacuolas han reaparecido en las células de la pared sinusal (E, flechas) y menos en los hepatocitos. En las células de Kupffer (F) las vacuolas se asemejan cualitativamente a las de los ratones de inyección simulada. Las inclusiones densas en los hepatocitos mostradas en A, C y E representan gotitas de lípidos, que se encuentran igualmente en los ratones de tipo salvaje correspondientes (no mostrados). Las barras representan 20 μ m y 2 μ m, respectivamente.

Figura 8: oligosacáridos neutros en extractos de tejidos de ratones con α -manosidosis inyectados dos veces con 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal

Los ratones de control (carril 1) y con α -manosidosis (carril 2 y 3) se inyectaron con PBS (carril 1 y 2) o 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal (carril 3) 7 y 3,5 días antes del análisis. Los oligosacáridos neutros se prepararon y se cuantificaron como en las Figuras 1 y 2. Se indica la migración de oligosacáridos compuestos de 2 a 9 residuos de manosa y un único residuo de N-acetilglucosamina (M2 a M9). Las flechas marcan material positivo a orcinol insensible a LAMAN. Los resultados en un conjunto duplicado de ratones (no mostrado) variaron en menos del 15%.

Figura 9: microscopía óptica de riñón en ratones con α -manosidosis

Se inyectaron ratones con α -manosidosis con PBS (A) o 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal (B) 7 y 3,5 días antes del sacrificio. Se muestra la franja exterior de la médula externa. Se observan numerosas vacuolas claras en la rama ascendente gruesa (TAL) del asa de Henle del ratón con inyección simulada (A, flechas) en contraste con el ratón tratado con LAMAN (B). Los túbulos rectos proximales (PST) están libres de vacuolas patológicas en cualquier animal. Las barras representan 20 μ m.

Figura 10: separación por HPLC de oligosacáridos neutros derivatizados con 2-antranilamida del cerebro

Los oligosacáridos neutros del cerebro de ratones con α -manosidosis inyectados con PBS (exploración superior) o 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal (exploración inferior) 7 y 3,5 días antes del sacrificio se mezclaron con 220 pmol de GlcNAc₄Man₃Gal₃ como patrón interno, derivatizado con 2-antranilamida y separada por HPLC. Se indican la posición del patrón interno y de los oligosacáridos compuestos de 2 a 9 residuos de manosa y un único residuo de N-acetilglucosamina (M2 a M9).

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción y caracterización de LAMAN

Procedimientos experimentales

Expresión y purificación de LAMAN humano recombinante en células CHO

El ADNc de LAMAN humano aislado de la biblioteca de ADNc de HepG2 y subclonado en un vector de expresión portador de un gen de dihidrofolato reductasa y el ADNc de LAMAN bajo el control del promotor de CMV humano se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en dihidrofolato reductasa. Las células CHO se cultivaron en un matraz CELLline de dos compartimentos (Integra Biosciences Inc.) en medio ExCell 302 exento de suero (JRH Biosciences) suplementado con metotrexato 20 nM a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%. El medio se diafiltró usando un filtro de polisulfona Pellicon Biomax con un límite de 100 kDa frente a 4 volúmenes de Tris-HCl 0,02 M, pH 7,6. La cromatografía de intercambio iónico se realizó en DEAE-Sefarosa FF (Amersham Pharmacia Biotech AB) usando un gradiente de NaCl en Tris-HCl 0,02 M, pH 7,6. Las fracciones activas se concentraron utilizando un filtro de centrifugación Amicon Centricon Plus-80 con un límite de 30 kDa y se sometieron a filtración en gel en una columna HiPrep 26/60 Sephacryl de Alta Resolución (Amersham Pharmacia

Biotech AB) en Tris-HCl 0,02 M, pH 7,6, que contiene 0,15 M de NaCl. Después de la concentración, la preparación final tuvo una actividad específica de 9-15 U/mg.

Expresión y purificación de LAMAN recombinante de ratón

El ADNc que codifica el LAMAN de ratón (16) se subclonó en el vector de expresión pMPSVEH (17). Se había agregado una cola de polihistidina (6 residuos) a la parte del terminal C de la enzima. Se transfectaron fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en los receptores de manosa 6-fosfato pequeños y grandes (mpr-/MEF) (18) y se seleccionaron clones de expresión estable con 50 µl/ml de higromicina. Para la producción de LAMAN de ratón recombinante, las células se cultivaron en medio suplementado con 10% de FCS en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. El LAMAN de ratón recombinante secretado se purificó a partir de medio acondicionado usando un procedimiento de tres etapas. En la primera etapa, el medio se dializó frente a regulador de fosfato de sodio 20 mM pH 7,8 que contenía cloruro de sodio 500 mM y luego se cargó en una columna Probond (Invitrogen). La enzima retenida se eluyó con un gradiente de 0 a 0,35 M de imidazol (volumen total 80 ml) en regulador de fosfato de sodio 20 mM pH 6,0 que contenía cloruro de sodio 500 mM. Las fracciones que contenían LAMAN se dializaron frente a fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0 y se cargaron en una DEAE-celulosa. La enzima se eluyó en un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 0,25 M (volumen total de 80 ml) en regulador de fosfato de sodio 10 mM. Finalmente, se adsorbió LAMAN de ratón a ConA-Sefarosa (regulador de carga Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, que contenía MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM y NaCl 0,5 M), y se eluyó con α-manopiranosido (0,0-1,0 M) en el mismo regulador. La preparación final tuvo una actividad específica de 17-25 U/mg.

Purificación de LAMAN bovino

El LAMAN bovino se purificó a partir de riñón como se describe (19). La preparación final tuvo una actividad específica de 10 U/mg.

Purificación del LAMAN humano

LAMAN se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO-) que se cultivaron en un matraz CellLine de dos compartimentos, a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. La enzima, obtenida de las células CHO, se purificó de acuerdo con un procedimiento de purificación que consta de 4 etapas:

Diafiltración

La diafiltración se basó en el modelo TFF, utilizando un filtro de polisulfona Pellicon Biomax con un límite de 100 kDa. La muestra se diafiltró contra aproximadamente 3 veces el volumen de muestra con Tris-HCl 0,02 M, pH 7,6.

Cromatografía de intercambio de iones

La cromatografía de intercambio iónico se realizó usando filtración de flujo DEAE Sefarosa. El regulador fue Tris-HCl 0,02 M, pH 7,6. El gel se empaquetó en una columna XK 16/20 de Amersham Pharmacia Biotech AB. La elución se realizó con un gradiente de NaCl.

Concentración de muestra

Antes de la filtración en gel, la muestra se concentró hasta una concentración de proteína de ~6 mg/ml y un volumen final de 10 ml. Esto se llevó a cabo utilizando un filtro de centrifugación Amicon Centricon Plus-80 con un límite de 30 kDa.

Filtración en gel

La filtración en gel se llevó a cabo en una columna HiPrep 26/60 Sephacryl de Alta Resolución de Amersham Pharmacia Biotech AB. La muestra se eluyó con Tris-HCl 0,02 M suministrado con NaCl 0,15 M, pH 7,6.

El ejemplo de una purificación de LAMAN se resume en la tabla a continuación. Normalmente, el rendimiento está en el intervalo de 30-50% y la actividad específica de 9-15 U/mg.

Sumario de la purificación de LAMAN

Etapas de Purificación	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Enzima cruda	3,3	0,89	1,00	100

Etapas de Purificación	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Diafiltración	2,0	2,28	2,56	130
Intercambio de iones	1,4	3,61	4,06	54
Concentración	5,8	6,01	6,75	66
Filtración en gel	0,8	10,87	12,21	64
Concentración	6,4	9,65	10,84	32

El LAMAN purificado se almacena a -80 °C.

- 5 Además, se desarrolla un proceso de purificación para rhLAMAN en una escala de 20-200 ml para escalar hasta la producción a gran escala. La calidad y pureza del producto final (rhLAMAN) es muy alta y de acuerdo con las especificaciones (aprobado para ensayos clínicos). El proceso incluye una etapa de captura, 1-2 etapas intermedias de purificación, 1 etapa de pulido, 1-2 etapas de eliminación de virus y 1 etapa de formulación. También se incluyen 1 o más etapas de intercambio regulador (diafiltración). El proceso a pequeña escala se transfiere a producción intermedia y finalmente a gran escala.

Diseño experimental: se prueban varios geles de cromatografía diferentes y se analizará el desempeño de los diferentes pasos mediante una batería de métodos analíticos que se describen brevemente a continuación:

Actividad enzimática:	Ensayo de alfa-manosidasa
Concentración total de proteína:	Análisis BCA
Concentración de rhLAMAN:	rhLAMAN ELISA
Pureza:	HPLC y SDS-PAGE
Identidad:	HPLC
Proteínas HCP:	ELISA
Nivel de endotoxina:	subcontrato a laboratorio de contrato

- 15 Esbozo del proceso de purificación en escala de columna de 20 ml
- 20 Etapa 1: Concentración/diafiltración
- El medio producido en matraces T-500 (0,06 U/ml) con rhLAMAN expresado se concentra aproximadamente 10 veces para usar filtración de flujo tangencial (TFF) contra un filtro de polisulfona Pellicon Biomax con límite de 100 kDa.
- 25 Ejemplo: 0,5-1,0 litros de medio producido por centrifugado se concentra usando TFF contra un filtro Biomax 100 kDa de 50 cm² a 50-100 ml. La presión transmembrana (TMP) es 25 (P de entrada= 30 psi; P de salida= 20 psi).
- Después de eso, se aplica diafiltración contra 7 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 con TMP de 25. La actividad específica de la muestra concentrada es 0,5-1,5 U/mg. Rendimiento 70-90%
- 30 Etapa 2: etapa de captura-DEAE sefarosa FF
- La muestra concentrada de la etapa 1 se aplica sobre una DEAE-sefarosa de 20 ml empaquetada en una columna de 16 mm de diámetro (Pharmacia XK 16) equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7,6 (denominado: regulador estándar).

La rata de flujo es de 3 ml/min. La proteína enlazada al gel DEAE se lava luego con 2-4 volúmenes de columna (CV) de regulador estándar seguido de 2-4 CVs de NaCl 30 mM en regulador estándar.

rhLAMAN se eluye con un gradiente lineal desde NaCl 30-300 mM en regulador estándar durante 20 minutos. Alternativamente para la producción a gran escala: la elución se logra aplicando NaCl 75-150 mM en regulador estándar. El gel DEAE se lava con 2-4 CVs de NaCl 0,5 M en regulador estándar seguido de 2,4 CVs de NaOH 1,0 M (tiempo de contacto 40-60 minutos). Las fracciones que contienen actividad de rhLAMAN se agrupan (actividad específica: 2-5 U/mg) y se usan para purificación adicional. Rendimiento 70-90%.

Etapa 3: etapa intermedia 1

1. Cromatografía de interacción hidrófoba: butil, fenil u octil sefarosa FF. El grupo de muestra de la etapa 2 se mezcla 1:1 con Na₂SO₄ 2,0 M y se aplica en una columna de HIC de 20 ml (butil-, fenil- u octil-sefarosa) empaquetada en una columna de 16 mm de diámetro (Pharmacia XK 16) equilibrada con regulador estándar + Na₂SO₄ 1,0 M. La rata de flujo es 3-4 ml/min. La columna se lava con 2-4 CVs del mismo regulador. rhLAMAN se eluye con regulador estándar y las fracciones que contienen actividad se agrupan y se usan para purificación adicional.

2. Macrorep, cerámica hidroxiapatita tipo I o II.

Breve descripción: Equilibrar columna (volumen de gel = 20 ml) con 4-6 CVs de fosfato de sodio 10 mM pH 7,6 (regulador A). Rata de flujo 2-5 ml/min. Regular la muestra de intercambio de la etapa 3 con TFF a regulador A. Cargar la muestra del paso 3 en la columna. Lavar con 2-4 CVs de regulador A. Eluir con regulador A que contiene NaCl 100 mM. Recolectar el pico que contiene actividad rhLAMAN.

Etapa 4: etapa intermedia 2

1. Macro preparación, cerámica hidroxiapatita tipo I o II, 40 um.

Breve descripción: ver la etapa 3

2. Fuente 15 Q – intercambiador de aniones

Equilibrar la columna con 4 CVs de Tris-HCl 200 mM, pH 7,6. Cambiar a 5 CVs de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 (regulador estándar). Rata de flujo: 2-5 ml/min. Cargar la muestra de la etapa 3 (debe estar en el regulador estándar antes de la aplicación) en la columna. Lavar con 2-4 CVs del regulador estándar. Aplicar un gradiente superficial desde 0 a 100% de NaCl 1 M en regulador estándar (rata de flujo 2 ml/min, tiempo de gradiente 50 minutos). Recolectar fracciones que contienen actividad rhLAMAN.

3. Fuente 15 S - intercambiador de cationes

Debería funcionar en pH ácido. Regulador de equilibrado = acetato de sodio 20 mM pH 4,5. Eluir con un gradiente de NaCl (aumento de la concentración de sal) o de pH (aumento del pH).

Etapa 5: etapa de pulido

1. Macro preparación, cerámica hidroxiapatita tipo II, 40 um.

Descripción de los parámetros: vea la etapa 3.

2. Fuente 15 Q - intercambiador de aniones

Descripción de los parámetros: ver etapa 4.

3. Fuente 15 S - intercambiador de cationes

Descripción de los parámetros: ver etapa 4.

4. Cromatografía de afinidad

Etapa 6: etapa de diafiltración/formulación

Se realiza una filtración de flujo tangencial (TFF) contra un filtro de polisulfona Pellicon Biomax con un límite de 100 kDa contra 5-10 x volúmenes de regulador de formulación. Dos reguladores de formulación son probados:

Regulador de formulación 1.

Na ₂ HPO ₄	3,10-3,50 mM
NaH ₂ PO ₄	0,4-0,6 mM
Glicina	25-30 mM
Manitol	220-250 mM

Agua para inyección (WFI)

Regulador de formulación 2.

Citrato de sodio	4,0-5,0 mM
Ácido cítrico	0,3-0,8 mM
Manitol	200-250 mM
Tween 80	3,0-5,0 mM

5

Agua para inyección (WFI)

El pH y la osmolalidad en ambos reguladores de formulación se equilibran a $7,5 \pm 0,2$ y 300 ± 50 mOsm/kg, respectivamente. La concentración de proteína final es de acuerdo con la especificación (> 5 mg/ml).

10

Etapas 7: formulación, llenado y secado por congelación

Formulación y forma de dosificación

15 En el desarrollo de la forma de dosificación, la estabilidad de rhLAMAN está enfocada. El proceso de desarrollo comienza con una solución acuosa y, muy probablemente, terminará como un producto secado por congelación. Se prueban dos formulaciones diferentes: regulador de formulación 1 y regulador de formulación 6, ver etapa 6.

20 Ambas formulaciones son conocidas por estabilizar proteínas en soluciones acuosas así como en polvos secados por congelación. El pH y la osmolalidad en ambos reguladores de formulación se equilibrarán a $7,5 \pm 0,2$ y 300 ± 50 mOsm/kg respectivamente. La concentración de proteína final debe estar de acuerdo con la especificación y en el intervalo de 4-10 mg/ml.

25 Se producirá un producto secado por congelación de rhLAMAN en una unidad de producción de acuerdo con la práctica EU GMP. El llenado y el secado por congelación se realizarán en una sala clasificada como Clase A. Durante la producción, la zona de llenado se controla con recuentos de partículas y placas de sedimentación. El personal se capacita regularmente de acuerdo con el GMP de la EU y se supervisa después de cada producción con impresiones de guantes. La esterilidad del equipo y los materiales se aseguran mediante procedimientos de esterilización validados.

30

Relleno

La sustancia farmacéutica a granel de rhLAMAN se llena asépticamente en viales de vidrio estériles tipo I.

35 Secado por congelación

Los viales se secado por congelación con ciclos de secado por congelación desarrollados específicamente para rhLAMAN en las dos formulaciones diferentes descritas anteriormente. El gas de nitrógeno se llena en los viales al final del ciclo y, eventualmente, se cierra con tapones y se tapa. El lote finalmente se analiza y es liberado de acuerdo con la especificación.

40

Determinación de la fosforilación de LAMAN

45 LAMAN se incubó durante la noche con una matriz de afinidad MPR 300 como se describe (20). La actividad de LAMAN se determinó en la fracción no enlazada y las fracciones se eluyeron con glucosa 6-fosfato 5 mM y manosa 6-fosfato 5 mM.

Resultados

50 LAMAN purificado a partir de tres especies diferentes se utilizó para el reemplazo enzimático en ratones con α -manosidosis (Figura 1). El LAMAN de riñón bovino está representado por una mezcla de polipéptidos (11-38 kDa) generada por proteólisis limitada a partir de un precursor común (19). Como se esperaba para una hidrolasa

lisosómica purificada a partir de tejido y por lo tanto expuesta a la actividad de fosfatasa endosómica/lisosómica, la enzima tiene un bajo contenido de marcador de reconocimiento de Man6P. Cuando se incubó con una matriz de afinidad de receptor Man6P, el 6,4% de la actividad LAMAN se enlazó a la matriz de una manera dependiente de Man6P.

El LAMAN recombinante de ratón y humano se aisló de las secreciones de fibroblastos de ratón deficientes en receptor de Man6P y de células CHO, respectivamente. Las enzimas se representaban en gran medida por sus formas precursoras, pero contenían una fracción variable (5-35%) de formas proteolíticamente procesadas de 55 y 70 kDa (figura 1). El ratón LAMAN tenía un mayor contenido de marcador de reconocimiento Man6P, que mediaba el enlace del 73,6% de la actividad a la matriz de afinidad. Del LAMAN humano solo el 4,2% se enlazó de una manera dependiente de Man6P a la matriz de afinidad del receptor Man6P, lo que indica que el contenido del marcador de reconocimiento de Man6P es tan bajo como para el LAMAN bovino.

Varios lotes han sido analizados posteriormente, por ejemplo:

Lote agrupado 2003-09 - 2004-02:	Fosforilación al 40 %
Lote 2004-02-02 - 06:	Fosforilación al 30 %
Lote agrupado 2003-01-21 - 04-16	Fosforilación al 42 %

En general, aproximadamente el 40% de la cantidad de enzima se enlaza a la matriz de afinidad. Se cree que el bajo grado de fosforilación observado para el LAMAN humano y bovino resulta del almacenamiento prolongado de las enzimas.

Ejemplo 2: Efectos de la administración in vivo de LAMAN en los niveles de oligosacáridos almacenados

Procedimientos experimentales

Inyección de los ratones

Se inyectó LAMAN en la vena de la cola de ratones con α -manosidosis de 8-14 semanas de edad (volumen final de hasta 5,3 μ l/g de peso corporal). Los ratones con inyecciones simuladas recibieron el mismo volumen de fosfato 10 mM, pH 7,4 en NaCl 0,15 M (PBS). En un solo experimento, los ratones que se originaron de hasta tres camadas no diferían en edad. 5 minutos después de la inyección, se tomó sangre del plexo retroorbital para controlar la cantidad de enzima inyectada. El suero fue preparado y almacenado a -20 °C.

Preparación de extractos de órganos

Los ratones se anestesiaron con 20 μ l de una solución de Ketavet 10 mg/ml (Parke Davis) y Rompun (Bayer) 2 mg/ml en NaCl 0,15 M y se perfundieron con PBS. Los órganos (hígado, bazo, riñón, corazón y cerebro) se recolectaron y almacenaron a -78 °C. Se homogeneizaron aproximadamente 50-70 mg de cada órgano a 4 °C en 9 volúmenes (por peso) de Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM (en isopropanol), yodoacetamida 1 mM, EDTA 5 mM. Se añadió Triton X-100 a una concentración final de 0,5% p/v (1% para el hígado). Después de incubar durante 30 minutos sobre hielo, las muestras se sometieron a sonicación y luego se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g. El sobrenadante se almacenó a -20 °C.

Ensayos enzimáticos

Para la determinación de la actividad de LAMAN en los extractos de órganos y en suero, se incubaron 10-50 μ l de muestra de enzima en 0,2 ml de citrato de sodio 0,2 M pH 4,6, NaN₃ al 0,08%, BSA al 0,4%, NaCl al 0,15% y p-nitrofenil- α -manopiranosido 10 mM como sustrato durante 0,5-5 horas a 37 °C. Se añadió 1 ml de glicina/NaOH 0,4 M, pH 10,4 para detener la reacción. La absorbancia se leyó a 405 nm (ϵ = 18.500 M⁻¹ cm⁻¹). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y con los blancos apropiados.

Inmunoprecipitación Western

Para la inmunoprecipitación Western de LAMAN humano se separaron 20-40 μ g de proteína en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis en SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF usando un sistema de inmunoprecipitación semiseco. La eficacia de transferencia se verificó con tinción de Ponceau. Las membranas se bloquearon posteriormente con leche desnatada en polvo al 5% y se incubaron con el anticuerpo primario en una dilución de 1:50.000 o 1:100.000. Después de lavar en PBS, Tween 20 al 0,1%, las

transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:20.000). Las señales se visualizaron usando el Sistema de Detección ECL (Amersham, Freiburg, Alemania).

Aislamiento de oligosacáridos neutros

5 Las muestras de tejido (50-60 mg) se cortaron en trozos pequeños y se homogeneizaron con 0,6 ml de H₂O (grado de HPLC) a 4 °C. Después de la congelación (-20 °C) y descongelación dos veces y el tratamiento ultrasónico, las proteínas se precipitaron mediante la adición de 4 vol de metanol y se extrajeron mediante la adición de 4 vol cloroformo/H₂O (1:3) (21). El sobrenadante se desaló por incubación durante 1 hora a 4 °C con resina de intercambio iónico de lecho mixto (AG 501-X8, malla 20-50). El material no enlazado se liofilizó y resuspendió en agua (1 ml por mg de tejido).

Separación de oligosacáridos de manosa por cromatografía en capa fina (TLC)

15 Los oligosacáridos neutros extraídos de alícuotas iguales de tejido se cargaron en placas de TLC (20x20 gel de sílice F60, Merck). Después de secar las placas a temperatura ambiente durante ~1 hora, los oligosacáridos se separaron al desarrollarse durante la noche con n-butanol/ácido acético/H₂O (100:50:50). Después de secar (~1 hora a temperatura ambiente y luego 5 minutos a 110 °C), las placas se desarrollaron durante 4 horas en n-propanol/nitrometan/H₂O (100:80:60). Para la tinción, a las placas se les aplicó por aspersión orcinol al 0,2% en H₂SO₄ (20% en agua) y se calentaron a 110 °C. El tamaño de los oligosacáridos se determinó mediante MALDI-TOF (ver a continuación).

Digestión de oligosacáridos hepáticos con α -glucosidasa o α -manosidasa de haba borriquita

25 Para evitar la interferencia con oligosacáridos derivados de glucógeno, se incubaron 20 μ l de los extractos de oligosacáridos hepáticos y de corazón durante la noche a 37 °C con 40 U/ml de α -glucosidasa de *Bacillus stearothermophilus* (Sigma) en fosfato 20 mM, pH 6,8. La mezcla de incubación se calentó a 96 °C para desnaturalizar las proteínas. Después de la centrifugación durante 10 min a 13.000 g, el sobrenadante se desaló por incubación 1 hora a 4 °C con una resina de intercambio iónico (AG 501-X8, malla 20-50), se liofilizó y se resuspendió en 20 μ l de agua, y luego se separó por TLC.

35 Para verificar la naturaleza de los oligosacáridos, se incubaron 20 μ l de los extractos de oligosacáridos durante la noche a 37 °C con 30 U/ml de α -manosidasa de haba borriquita (Sigma) en acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0, que contiene ZnCl₂ 2 mM. Después de la incubación, los oligosacáridos se prepararon como se describe para las muestras digeridas con α -glucosidasa y se separaron por TLC.

Análisis cuantitativo de oligosacáridos neutros en órganos

40 Los oligosacáridos (0,3 μ l) se mezclaron con 220 pmol de un decaacárido que sirvió como patrón interno y tenía la composición GlcNAc₄Man₃Gal₃. La mezcla se liofilizó y se resuspendió en 5 μ l de un DMSO/ácido acético (7:3) que contenía 2-antranilamida (Aldrich) 0,34 M y NaBH₃CN (Fluka) 1 M. Después de la incubación 2 horas a 65 °C, las muestras se purificaron por cromatografía en papel (desarrollado con acetato de etilo). Los oligosacáridos, localizados en el punto de partida, se extrajeron sometiendo a sonicación el papel en agua, se liofilizaron, se resuspendieron en 300 μ l de acetonitrilo/formiato de amonio 80 mM, pH 4,4 (65:35), se cargaron en una columna de Glucosefarsa (Ludger) y se eluyeron a una rata de flujo de 0,4 ml/min con el regulador de acetonitrilo/formiato de amonio. Se registró la fluorescencia (excitación 350 nm, emisión 450 nm) (Shimadzu, RF-10A XL) y la masa de los oligosacáridos fue determinada por MALDI-TOF.

MALDI-TOF

50 Las muestras de las fracciones de HPLC se liofilizaron y se disolvieron en 2-3 μ l de agua. Los extractos de agua de las placas de TLC se derivaron con 1-fenil-3-metil-5-pirazolona y se disolvieron en 2-3 μ l de agua. Se utilizó como matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB, 5 mg/ml en agua). Se sembraron 0,5 μ l de DHB y 1 μ l de muestra en el objetivo Anchorchip (Bruker Daltonik), y se secaron a temperatura ambiente. El análisis de espectrometría de masas se realizó en un MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltonik) con un láser UV de 337 nm.

Exámenes histológicos

60 Para microscopía electrónica, se sumergieron en fosfato 0,1 M, glutaraldehído al 6%, pH 7,4, pequeñas secciones de hígado y riñón en el momento del sacrificio. Las muestras de tejido se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 2%, se deshidrataron y se incrustaron en Araldite. Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina. Las secciones ultrafinas se procesaron de acuerdo con técnicas estándar. Para las investigaciones histoquímicas, las secciones se sumergieron con solución de Bouin diluida 1:4 en fosfato 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M. La incrustación se realizó en parafina de bajo punto de fusión (Wolff, Wetzlar, Alemania). Las secciones en serie (7 μ m) se cortaron y se montaron en portaobjetos de vidrio cubiertos con Biobond (British Biocell, Londres, Reino Unido). Las secciones centrales de cada serie se tiñeron con hematoxilina y eosina para microscopía de luz estándar.

Resultados

Efecto corrector de una sola inyección intravenosa de LAMAN de ratón

Con el fin de estudiar el efecto a corto y largo plazo de una dosis única de LAMAN en el almacenamiento de oligosacáridos neutros, los ratones con α -manosidosis a la edad de 9 semanas recibieron 100 mU de LAMAN de ratón por g de peso corporal por vía intravenosa. Para controlar la cantidad de enzima inyectada y su eliminación de la circulación, se tomó sangre 5, 30 y 60 minutos después de la inyección. 5 minutos después de la inyección, la actividad de LAMAN varió en menos de $\pm 6\%$, lo que indica que los ratones habían recibido cantidades comparables de enzima. La enzima se eliminó de la circulación con una vida media de menos de 20 minutos. Los ratones se sacrificaron 2, 4 y 10 horas después de la inyección y se prepararon extractos de órganos para la determinación de la actividad de LAMAN y oligosacáridos neutros. La actividad máxima de LAMAN en los órganos se observó 2-4 horas después de la inyección (Tabla 1). En el hígado, la actividad era 6-7 veces mayor que en los ratones de control, pero también en el bazo y el corazón los valores máximos excedían los de los controles. En el riñón un máximo de un cuarto de la actividad se alcanzó en ratones de control. Es probable que la pequeña actividad que se observa en el cerebro sea LAMAN presente en el sistema vascular. Entre las 4 y 10 horas después de la inyección, la actividad enzimática disminuyó rápidamente en hígado, bazo y riñón con una vida media aparente de aproximadamente 3 horas. La inmunoprecipitación Western demostró que el precursor internalizado de LAMAN se procesó rápidamente a formas maduras (no se muestra).

La característica distintiva de la α -manosidosis es el almacenamiento de oligosacáridos neutros en una amplia variedad de tejidos (véase la Figura 2, carril 1 y carril 2). Estos oligosacáridos contienen 2-9 residuos de manosa y un residuo de N-acetilglucosamina en su terminal reductor y, por lo tanto, resultan de la acción de una endoglucosaminidasa. La cantidad de oligosacáridos neutros en hígado y bazo disminuyó progresivamente con el tiempo al 15% y al 7% en animales con inyección simulada, mientras que en riñón y corazón el almacenamiento se redujo solo a aproximadamente 49% y 74% (Figura 2).

Tabla 1: Actividad de LAMAN en extractos de tejido de ratones control y con α -manosidosis antes y después de la inyección de 100 mU de LAMAN de ratón por g de peso corporal. * +/- se refiere a ratones de control, -/- a ratones con α -manosidosis, y n al número de animales investigados.* Todos los valores se corrigieron para la actividad media de α -manosidasa en suero en t_{cero} (2.350 mU/ml de suero). Los factores de corrección fueron 0,98, 1,07 y 0,96 para 2, 4 y 10 horas respectivamente.

Genotipo	LAMAN inyectado (100mU/g de peso corporal)	LAMAN (mU/g peso húmedo)				
		Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Cerebro
(+/+)* (n)	-	136,7 $\pm$ 29,1 (19)	116,3 $\pm$ 44,5 (3)	168,4 $\pm$ 34,5 (9)	12,6 $\pm$ 3,1 (3)	25 $\pm$ 1 (2)
(-/-)* (n)	-	2,9 $\pm$ 2,5 (21)	2,8 $\pm$ 2,1 (4)	2,5 $\pm$ 1,1 (10)	0,6 $\pm$ 0,5 (3)	0,4 $\pm$ 0,3 (3)
	2h ⁺	1.057	185	26	22	2,9
	4h ⁺	883	183	40	5	1,4
	10h ⁺	197	36	10	2	1,0

Para determinar cuánto tiempo persiste el efecto correctivo de una dosis única de LAMAN, se examinaron los ratones 4, 8 y 16 días después de la inyección de 100 mU de LAMAN de ratón por g de peso corporal. En todos los momentos, la actividad LAMAN en los órganos (bazo, riñón, corazón, cerebro) estaba en el intervalo de ratones con α -manosidosis no tratados o con inyección simulada, a excepción del hígado, donde 4 días después de la inyección la actividad LAMAN (15,1 mU/g de peso húmedo) era todavía aproximadamente 5 veces mayor que en los ratones inyectados de manera simulada. El almacenamiento de oligosacáridos neutros en hígado, bazo y riñón 4 días después de la inyección estaba en el intervalo visto 10 horas después de la inyección (comparar la Figura 2 y la Figura 3). En el corazón, el almacenamiento disminuyó del 74% después de 10 horas al 42% después de 4 días. Esto indica que el efecto corrector observado después de 10 horas persiste durante aproximadamente 4 días a pesar del hecho de que se detecta poca o ninguna actividad de LAMAN 10 horas después de la inyección en órganos tales como riñón o corazón. Después de 4 días, el almacenamiento de oligosacáridos claramente comenzó a aumentar de nuevo. El aumento observado entre el día 4 y el día 16 después de la inyección correspondió al 20-40% del almacenamiento observado en ratones con α -manosidosis con inyección simulada (Figura 3).

Comparación de la eliminación y el efecto corrector de LAMAN bovino, de ratón y humano

Para comparar el efecto corrector de las preparaciones de LAMAN de las tres fuentes, a los ratones se les inyectó una dosis de LAMAN que se esperaba que produjera una corrección parcial. Por lo tanto, se inyectaron 50 mU de LAMAN por g de peso corporal. El LAMAN bovino y humano se eliminaron rápidamente de la circulación con vidas medias de 4 minutos y 8 minutos, respectivamente (figura 4). La eliminación del LAMAN de ratón altamente fosforilado fue más lento y al menos bifásico. Aproximadamente el 85% de la enzima se eliminó con un medio tiempo aparente de 12 minutos, mientras que la eliminación aparente de la fracción restante fue de aproximadamente 47 minutos (figura 4).

Los ratones se sacrificaron 2 días después de la inyección y los extractos de hígado, bazo, riñón y corazón se examinaron para oligosacáridos neutros (Figura 5). Con la excepción del hígado, el efecto correctivo fue mayor para el LAMAN humano y más bajo para el LAMAN bovino. El efecto corrector de la enzima del ratón fue intermedio. Solo en el hígado fue el efecto corrector de la enzima bovina (4% del almacenamiento restante) más pronunciada que la de la enzima humana (14% del almacenamiento restante). En el hígado, el efecto corrector del LAMAN de ratón fue el más débil (23% del almacenamiento restante).

Efecto corrector de LAMAN humano a dosis alta

La comparación del LAMAN bovino, de ratón y humano indicó que el LAMAN humano pobremente fosforilado tenía un potencial corrector relativamente mayor en riñón y corazón, dos órganos que son más resistentes a la corrección metabólica que el hígado y el bazo. Para evaluar el potencial corrector de la enzima humana, inyectamos una dosis única de 250 mU de LAMAN y analizamos los ratones 1 a 12 días después de la inyección. En el hígado, el almacenamiento se corrigió por completo 1 y 3 días después de la inyección. Después de 6 y 12 días, los oligosacáridos neutros comenzaron a acumularse de nuevo, pero alcanzaron solo aproximadamente el 30% del nivel de almacenamiento antes del tratamiento (figura 6). El examen al microscopio óptico del hígado reveló la desaparición casi completa de vacuolas de almacenamiento, que son prominentes en células endoteliales sinusales, células de Kupffer y hepatocitos de ratones con α -manosidosis no tratados y reaparecen 12 días después de la inyección (Figura 7). En bazo y riñón, el almacenamiento de oligosacáridos neutros disminuyó a 12 y 18%, respectivamente. Es de destacar que en el bazo y el riñón se observó la corrección máxima después de 3 y 6 días, respectivamente. En ambos órganos, los oligosacáridos neutros comenzaron a reaccumularse 3 y 6 días después de la inyección (ver Figura 5). Los oligosacáridos neutros en el cerebro de los ratones con α -manosidosis no se vieron afectados por el tratamiento (no se muestra).

Las actividades de LAMAN humano recuperadas 24 horas después de la inyección fueron mucho más altas de lo esperado de los experimentos con LAMAN de ratón. En el hígado, la actividad LAMAN humana era todavía 6 veces mayor que en el hígado control. En el bazo y el riñón representaba el 10-15% de los del control. Para seguir la absorción y la estabilidad de la enzima humana, se determinó la actividad de LAMAN en extractos de tejidos preparados 4, 16 y 24 horas después de la inyección de 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal. Menos del 20% del LAMAN inyectado se recuperó después de 4 horas en los tejidos examinados (hígado 18%, riñón 0,4%, bazo 0,12% y corazón 0,04%). Cuando se compara con la absorción de LAMAN de ratón y teniendo en cuenta que se inyectó una cantidad 2,5 veces mayor de LAMAN humano, la actividad recuperada en hígado, riñón y corazón 4 horas después de la inyección fue comparable para ambas preparaciones enzimáticas (comparar la Tabla 1 y la Tabla 2). La absorción por el bazo parece ser 2-3 veces menos eficiente para la enzima humana. La mayor diferencia entre la enzima humana y la de ratón fue la mayor estabilidad del LAMAN humano internalizado por hígado, riñón y bazo. Mientras que la actividad del LAMAN humano había disminuido en estos órganos después de 24 horas a 17-33% del valor de 4 horas (ver Tabla 2), la de la enzima del ratón había disminuido a 20-26% del valor de 4 horas ya después de 10 horas (ver Tabla 1).

El efecto corrector del LAMAN de ratón (ver Figura 3) y humano solo fue transitorio. Los oligosacáridos neutros comenzaron a reaccumularse 3 a 6 días después de la inyección. Aumentar la cantidad de enzima inyectada sería un medio para retrasar la reaccumulación. Se espera que el efecto corrector de una dosis dada de LAMAN sea mayor cuando se administra como dos medias dosis separadas por un intervalo apropiado que como una dosis única. En lugar de aumentar la cantidad de LAMAN a 500 mU/g de peso corporal, administramos dos veces 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal cada uno, el día 7 y 3,5 antes del análisis. Esto dio como resultado una corrección completa del almacenamiento en riñón y corazón (Figura 8). El examen al microscopio de luz demostró la ausencia de vacuolas de almacenamiento en el hígado (no se muestra) y en el epitelio tubular del riñón (Figura 9). El almacenamiento residual en el bazo fue inferior al 20% del de los ratones con α -manosidosis con inyección simulada. Lo más notable es que en el cerebro, el nivel de oligosacáridos neutros cuantificados por TLC era solo la mitad de lo que ocurría en el cerebro de ratones con α -manosidosis con inyección simulada (figura 8).

TABLA 2: Actividad de LAMAN en extractos tisulares de ratones con α -manosidosis 4-24 horas después de la inyección de 250 mU de α -manosidosis humana por g de peso corporal. *Todos los valores se corrigieron para la actividad media de LAMAN en suero a t_{cero} (5.012 mU/ml de suero). Los factores de corrección se variaron entre 0,903 y 1,222. * Para la actividad de LAMAN en extractos de tejidos de ratones control y ratones no inyectados, véase la Tabla 1.

Horas después de la inyección	LAMAN (mU/g peso húmedo)*				
	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Cerebro
4	2.774	157	81	21	2,1
8	2.639	65	45	8	1,7
16	1.549	31	26	10	2,7
24	796	24	16	6	3,0

Para cuantificar los oligosacáridos neutros sobre una base molar, los oligosacáridos neutros extraídos del cerebro de los ratones con α -manosidosis inyectados con LAMAN y con inyección simulada se hicieron reaccionar con 2-antranilamida, que introduce una etiqueta fluorescente en los terminales reductores de los oligosacáridos. Los oligosacáridos marcados fluorescentemente se separaron por HPLC y se cuantificaron por comparación con un patrón interno de oligosacárido añadido antes de la derivatización con 2-antranilamida (Figura 10). Las principales especies de oligosacáridos en el cerebro de los ratones con α -manosidosis contienen 2, 3 o 4 residuos de manosa. Están presentes a concentraciones de 319, 87 y 164 pmol/g de tejido, respectivamente, y representan el 61% de todos los oligosacáridos neutros en el cerebro. En el cerebro de los ratones con α -manosidosis tratados, la concentración de los oligosacáridos neutros disminuyó al 26% de los ratones inyectados de manera simulada. El efecto corrector se observó para cada una de las especies de oligosacáridos pero fue relativamente más alto para las especies con 9, 7 y 4 residuos de manosa (véase la Figura 10).

En el presente estudio se utilizó LAMAN purificado a partir de riñón bovino. Esta preparación enzimática consistió en polipéptidos maduros con un bajo contenido de manosa 6-fosfato. El LAMAN humano recombinante aislado de la secreción de células CHO consistía principalmente en la forma precursora, pero también estaba pobremente fosforilado. El bajo contenido de manosa 6-fosfato de esta preparación probablemente se deba a la desfosforilación durante el aislamiento. Ocasionalmente, se obtuvieron preparaciones LAMAN humanas de las cuales hasta el 40% se enlazaron a la columna MRP 300 (C. Andersson, D. P. Roces, observación no publicada). El LAMAN de ratón recombinante purificado de las secreciones de fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de receptores de manosa 6-fosfato, se fosforiló en gran medida y se representó por la forma precursora. La eliminación de la circulación fue más rápida para las dos preparaciones de LAMAN pobremente fosforiladas de las células de riñón bovino y CHO que para el LAMAN de ratón altamente fosforilado. La absorción por órganos de las diferentes preparaciones de LAMAN no se comparó directamente. Sin embargo, la comparación de los datos de diferentes experimentos sugiere que el hígado, el riñón y el corazón absorben fracciones similares de LAMAN humano pobremente fosforiladas y de LAMAN de ratón altamente fosforiladas. Solo en el bazo la absorción fue diferente y se facilitó por una mayor fosforilación. En un estudio relacionado sobre la captación de β -glucuronidasa fosforilada y no fosforilada en ratones no se observaron diferencias en la absorción en el hígado y bazo, mientras que la absorción en el riñón y corazón fue mayor para la enzima fosforilada (26). Para las preparaciones de α -galactosidasa que difirieron en glucosilación y fosforilación, se observó una absorción similar por hígado, bazo y riñón (27). Esto indica que el efecto de la glucosilación y la fosforilación en la absorción de enzimas lisosómicas en diferentes órganos depende de la enzima.

Una gran diferencia entre las preparaciones de LAMAN de diferentes fuentes es su estabilidad. Suponiendo una cinética de primer orden, la actividad del LAMAN de ratón (ver Tabla 1) y bovino (no mostrado) disminuyó en hígado, riñón y bazo con una vida media aparente de 3 horas o menos, mientras que la vida media aparente del LAMAN humano fue más de 3 veces más larga. Esto puede explicar la mayor eficacia correctiva del LAMAN humano en el almacenamiento de oligosacáridos en bazo, riñón y corazón (véase la Figura 5).

Una sola administración intravenosa de LAMAN condujo a una disminución rápida y pronunciada del almacenamiento lisosómico de oligosacáridos neutros independientemente de la fuente de la enzima. El efecto correctivo fue más pronunciado en el hígado. Este es también el tejido donde el aumento de la actividad de LAMAN en relación con el de los ratones de tipo salvaje fue mayor. El examen histológico reveló una corrección del almacenamiento en las células del hígado parenquimatoso y no parenquimatoso. Esto fue cierto para el LAMAN de ratón altamente fosforilado (no mostrado) y para el LAMAN humano pobremente fosforilado (véase la Figura 7). Esto fue inesperado ya que un estudio anterior con β -glucuronidasa había demostrado que las enzimas de forma no fosforiladas se localizan casi exclusivamente en las células hepáticas no parenquimatosas, mientras que las formas fosforiladas se localizan en las células hepáticas parenquimatosas y no parenquimatosas (26). El efecto correctivo de LAMAN fue transitorio en todos los tejidos. Los oligosacáridos neutros comenzaron a reaccumularse 2 a 6 días después de la inyección.

Se observó una notable corrección del almacenamiento cuando se repitió después de 3,5 días la inyección de 250 mU de LAMAN humano por g de peso corporal, que reduce el almacenamiento en bazo y riñón en 80-90%. En una semana, el almacenamiento desapareció no solo en el hígado, sino también en el riñón y el corazón. Más importante

aún, la concentración de oligosacáridos neutros también disminuyó en el cerebro a aproximadamente un cuarto. Este último no se puede atribuir a una absorción de LAMAN en las células neuronales. En ratones, la barrera hematoencefálica madura dentro de las dos primeras semanas de vida y las enzimas lisosómicas administradas por vía intravenosa después de este período no atraviesan la barrera hematoencefálica (28-31). De acuerdo con estas observaciones, observamos trazas de LAMAN en homogeneizados de cerebro en ratones tratados (ver las Tablas 1 y 2). Estas actividades se atribuyen a células extraneurales, como el endotelio, el epitelio del plexo coroideo y las meninges incompletamente eliminadas. Ya que es poco probable que el LAMAN administrado tenga acceso a oligosacáridos almacenados en células neuronales y gliales, deben considerarse mecanismos alternativos. La eliminación de oligosacáridos a través de la circulación sanguínea o mediante un flujo mejorado del fluido cerebroespinal puede contribuir a la disminución del almacenamiento de oligosacáridos neutros en el cerebro.

Ejemplo 3: rhLAMAN: Eficacia de la terapia de reemplazo de dosis repetidas en ratones con α -manosidosis

El objetivo del estudio es

- Demostrar una corrección total del almacenamiento de oligosacáridos de manosa en todos los tejidos periféricos y verificar la corrección del almacenamiento en el cerebro.
- Determinar si la inyección de una dosis repetida de rhLAMAN también tiene un efecto sobre las actividades de LAMAN medidas en los diferentes tejidos periféricos.
- Seguir el desarrollo de anticuerpos después de las inyecciones repetidas, y verificar si precipitan la enzima. Determinar si, una vez que los ratones desarrollaron anticuerpos, estos tienen un efecto sobre la eliminación de la enzima.
- Determinar si un mayor nivel de anticuerpos tiene un efecto sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB).
- Comparar la expresión génica de ratones anulados, anulados inyectados y de tipo salvaje después de 1 y 4 semanas de tratamiento. Se realizará un experimento de micro matrices con ARN del hígado. Los ratones utilizados para este experimento se seleccionan entre reproducciones heterocigotas (véase a continuación).

Justificación del sistema de prueba

Elemento de prueba

El elemento de prueba se suministra como una solución de 5,4 mg.ml⁻¹ (8,2 U/mg, lote 041202) y se utiliza tal como se suministra. El elemento de prueba se almacena congelado (ca -20 °C) en el dispensario cuando no se usa.

Animales y manejo

Para el experimento se usan 5 grupos diferentes de ratones:

- (-/-) ratones con α -manosidosis
- (+/+) C57/B6 (ratones tipo salvaje)
- (+/-) ratones heterocigotos que son descendientes de un cruce entre ratones con α -manosidosis (-/-) y ratones C57/B6 (+/-)
- (-/-) ratones con α -manosidosis de cruces heterocigotos (ratones +/-)
- (+/+) ratones de tipo salvaje de cruces heterocigotos (ratones +/-)

Edad: 8 semanas al inicio del estudio

Número de animales: 64 ratones (machos y/o hembras)

Estado de salud: Los animales sospechosos de estar enfermos son eliminados del estudio. Si un número significativo de animales no son adecuados, se rechaza el lote completo de animales y se obtiene un nuevo lote.

Aclimatación: Se le permite a los animales aclimatarse al alojamiento por un mínimo de 3 días antes del comienzo de la dosificación.

Asignación a los grupos de dosis: Todos los animales se pesan y el número requerido de animales se asigna aleatoriamente a los 5 grupos de dosis. No es necesaria una estratificación de peso y/o sexo, ya que la dosis se ajusta en peso, y no se encontraron diferencias específicas por sexo hasta el momento. Solo los machos se usan para el experimento de Micromatriz (grupos 2*, 4* y 5*, ver a continuación), ya que en los estudios de expresión génica, el sexo ha sido frecuentemente descrito como un factor relevante.

Ambiente de la habitación: Los animales están alojados en jaulas de 4/jaula u 8/jaula, en una jaula de polipropileno con tapas de malla de acero inoxidable y fondos sólidos con virutas de madera como material de cama. Las jaulas (267 x 207 x 104 mm o 425 x 266 x 188 mm) se cambian según sea necesario.

Las jaulas se proveen con una botella de agua de polycarbonato (capacidad de 250 ml) con una boquilla de acero inoxidable y tapa Durethane. Las botellas de agua se llenan según sea necesario y se cambian/lavan al menos una vez a la semana.

Existe un control automático de la temperatura y la humedad, los intervalos objetivo son de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $50\% \pm 15\%$, respectivamente, con un flujo de aire de la habitación diseñado para dar un mínimo de 15 cambios de aire por hora. Los intervalos de temperatura y humedad son monitoreados y registrados diariamente. Hay control automático del ciclo de luz; las horas de luz normalmente son 0600-1800.

Dieta y suministro de agua

El alimento y agua están disponibles para los animales ad libitum. No se considera que el alimento y el agua contengan sustancias adicionales, en concentración suficiente, para influir en el resultado del estudio.

Tratamiento

Grupos de dosis/Nivel de dosis

Grupo 1 (para investigaciones bioquímicas, 16 ratones LAMAN). Los ratones se tratan dos veces por semana por vía intravenosa con 250 mU/g de peso corporal de rhLAMAN, y se sacrifican grupos de 4 ratones después de 1, 2 y 4 semanas de tratamiento.

Grupo 2* (para investigaciones con micromatrices, 8 ratones LAMAN de cruce heterocigoto), se tratan dos veces por semana por vía intravenosa con 250 mU/g de peso corporal de rhLAMAN, y se sacrifican grupos de 3 ratones después de 1 y 4 semanas de tratamiento.

Grupo 3 (para investigaciones de barrera hematoencefálica, anticuerpos y eliminación plasmática, 12 ratones LAMAN), se tratan una vez a la semana con 250 mU/g de peso corporal de rhLAMAN. Ambos grupos de ratones, los 4 ratones utilizados para las investigaciones de BBB, y los 4 ratones utilizados para la investigación de eliminación, son sacrificados después de 4 semanas de tratamiento.

Grupo 4 (ratones con tratamiento simulado, 12 ratones LAMAN) se tratan una vez/dos veces a la semana con vehículo para rhLAMAN al mismo volumen de dosis que los animales tratados en el grupo 3/grupo 1. Un grupo de 4 ratones inyectados una vez a la semana son sacrificados después de 4 semanas de tratamiento (para ser comparado con ratones del grupo 3), y se sacrifican grupos de 2 ratones después de 1, 2 y 4 semanas de tratamiento (para ser comparado con el grupo 1)

Grupo 4* (ratones con tratamiento simulado, 8 ratones LAMAN de cruce heterocigoto) y el Grupo 5* (8 de tipo salvaje de cruce heterocigoto) se tratan dos veces por semana con vehículo para rhLAMAN al mismo volumen de dosis que los animales tratados en el grupo 2*. Grupos de 3 ratones son sacrificados después de 1 y 4 semanas.

*Ratones con α -manosidosis de reproducciones heterocigotos (+/-), descendientes de una reproducción entre ratones con α -manosidosis (-/-) y C57/B6 de tipo salvaje (+/+).

Tabla 3: Asignación de animales a grupos de dosis:

Animales		ratones anulados LAMAN (inyectados con LAMAN)						No. de inyecciones
No. de grupo		1A		1C	2A*	2B*	3A	3B
Tiempo de Tratamiento	tiempos de sacrificio	Micromatrices				Azul Evans	ratones Ab-	
t ₀		36x	+	+	+	+	+	36x
t _{0,5w}		24x	+	+	+	+		24x

Animales		ratones anulados LAMAN (inyectados con LAMAN)						No. de inyecciones
No. de grupo		1A		1C	2A*	2B*	3A	3B
Tiempo de Tratamiento	tiempos de sacrificio					Micromatrices	Azul Evans	ratones Ab-
t _{1w}	t _{1w}	29x	+	+	3*	+	+	+
t _{1,5w}		17x	+	+		+		
t _{2w}	t _{2w}	25x	4	+		+	+	+
t _{2,5w}		13x		+		+		
t _{3w}		25x		+		+	+	+
t _{3,5w}		13x		+		+		
t _{4w}	t _{4w}	-		4		3*	4	4
No			4	4	3	3	4	4
Repuesto				+4		+2		+4

Tabla 3: Asignación de animales a grupos de dosis (continuación)

Animales		ratones LAMAN anulados						ratones tipo salvaje		No. de inyecciones
No. de grupo		4A	4B	4C	4D	4E*	4F*	5A*	5B*	
Tiempo de tratamiento	tiempos de sacrificio	Control simulado tratamiento						Controles tratamiento simulado		
t ₀		+	+	+	+	+	+	+	+	36x
t _{0,5w}		+	+	+		+	+	+	+	24x
t _{1w}	t _{1w}	2	+	+	+	3*	+	3*	+	29x
t _{1,5w}			+	+			+		+	17x
t _{2w}	t _{2w}		2	+	+		+		+	25x
t _{2,5w}				+			+		+	13x
t _{3w}				+	+		+		+	25x
t _{3,5w}				+			+		+	13x
t _{4w}	t _{4w}			2	4		3*		3*	-
No		2	2	4	2	3	3	3	3	
Repuesto							+4		+2	

5 Ruta, duración y método de administración

El elemento de prueba se administra a través de una inyección intravenosa (bolo) a una de las venas laterales de la cola en los niveles de dosis objetivo. El volumen de dosis requerido se calcula de acuerdo con el peso corporal registrado más recientemente en los animales.

Antes de la administración, los ratones se anestesian (intraperitoneal) con 75 µl por 100 g de peso corporal de una solución de 10 mg/ml de Ketavet (Parke Davis) y 2 mg/ml de Rompun (Bayer) y se mantienen a 37 °C hasta que se recuperan de la anestesia.

5 Observaciones

Viabilidad

10 Todos los animales son revisados para viabilidad temprano en la mañana y lo más tarde posible todos los días. Cualquier animal que muestra signos de debilidad o intoxicación severa y se considera en estado moribundo, es sacrificado. Cualquier animal muerto in extremis o encontrado muerto se somete, siempre que sea posible, a un examen post mortem macroscópico el día de la muerte. Si no es factible realizar el examen macroscópico post mortem el día de la muerte (por ejemplo, fines de la tarde o fines de semana), el cadáver se coloca en una bolsa de polietileno y se guarda en el refrigerador (4 °C) hasta el examen del día siguiente.

15 Signos Clínicos

Todos los animales se observan en días de dosificación por reacción al tratamiento. Se registra el inicio, la intensidad y la duración de cualquier signo observado.

20 Peso corporal

Antes de la dosificación, todos los animales se pesan semanalmente y registrados y tabulados.

25 Investigaciones de laboratorio

Verificación de tratamiento

30 Cinco minutos después de la inyección, se toma sangre del plexo retroorbital para medir los niveles plasmáticos de rhLAMAN (de acuerdo con el procedimiento interno no. 2). Si un animal no recibió la dosis completa, se calcula el % de la cantidad que falta y se le da al animal el mismo día.

Cinética

35 De 4 ratones del grupo 3, la sangre del plexo retroorbital se recolecta un día antes de la inyección, y también 5, 15 y 30 minutos después de cada inyección, para investigar un posible efecto del Ab en la eliminación de la enzima.

40 Cuando la enzima aún está disponible al final del experimento (4 semanas), el tratamiento de estos ratones continuará hasta 8 semanas.

Determinación de anticuerpo

45 Antes de dosificar, se toma sangre del plexo retroorbital de los animales del grupo 2, así como de todos los otros animales en la terminación con el fin de medir los títulos de anticuerpos.

Estudios terminales

Método de sacrificio

50 Los ratones son anestesiados con 600 µl de una solución de 10 mg/ml de Ketavet (Parke Davis) y 2 mg/ml de Rompun (Bayer) en 0,15 M de NaCl, se perfunden con PBS y se sacrifican por sangrado.

55 Para todos los grupos excepto el grupo 3, el sacrificio se lleva a cabo tres días y medio después del último tratamiento. Para el grupo 3, los ratones se sacrifican 1 semana después del último tratamiento (ver tabla 3).

Histopatología

60 Los siguientes órganos se recolectan y se fijan con NaPi 0,1 mM/glutaraldehído al 6% regulado a pH 7,4: hígado, riñón, cerebro

Las secciones pequeñas se cortan con una hoja de afeitar, y los portaobjetos fijos se someten a un análisis de microscopía electrónica.

Concentraciones tisulares de LAMAN

65

Homogeneizados de hígado, bazo, riñón, corazón, cerebro en TBS/PI (inhibidores de proteasa) se miden para actividad de LAMAN utilizando p-nitrofenil- α -manopiranosido como sustrato y citrato de sodio 0,2 M pH 4,6, NaN₃ al 0,08%, BSA al 0,4% como regulador.

5 El procesamiento de LAMAN es seguido por inmunoprecipitación Western (se necesita ~1mU).

Oligosacáridos tisulares

10 A partir de los órganos descritos en 10,3 se prepara una preparación de extractos de oligosacáridos neutros y se cuantifica por densitometría para estudiar la normalización del almacenamiento en los órganos por TLC de acuerdo con los procedimientos no 4 y 5.

Los oligosacáridos neutros del hígado y el corazón serán digeridos con α -glucosidasa, para evitar la interferencia del glucógeno.

15 Análisis estadístico de los resultados

A menos que se indique lo contrario, todas las pruebas estadísticas serán de dos caras y se realizarán al nivel de significancia del 5% utilizando el software interno.

20 Se realizan las siguientes comparaciones por pares:

Grupo Vehículo Control 4A vs Grupo 1A

25 Grupo Vehículo Control 4B vs Grupo 1B

Grupo Vehículo Control 4C vs Grupo 1C

30 Grupo Vehículo Control 4D vs Grupo 3A

Grupo Vehículo Control 5A*, 5B* vs Grupo 4E*, 4F*

Grupo Vehículo Control 5A*, 5B* vs Grupo 2A*, 2B*

35 Grupo Vehículo Control 4E*, 4F* vs Grupo 2A*, 2B*

Los datos se analizan para determinar la normalidad de la distribución utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y los gráficos Q-Q. Cuando se puede suponer una distribución normal, las diferencias entre los grupos se prueban usando modelos lineales (ANOVA) con o sin suposición de homocedasticidad. Si los datos (o los datos transformados en logaritmo) no se distribuyen normalmente, se utiliza una prueba de Kruskal-Wallis. Se pueden realizar etapas de análisis de datos adicionales según los datos.

(*reproducción heterocigota, véase a continuación)

45 Referencias

1. Ockerman, P. A. (1967) A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet* 2, 239-241

50 2. Hocking, J.D., Jolly, R.D. and Blatt R.D. (1972) Deficiency of α -mannosidase in Angus cattle. An inherited lysosomal storage disease. *Biochem. J.* 128, 69-78

3. Burditt, L.J., Chtai, K., Hirani, S., Nugent, P.G., Winchester, B. and Blakmore, W.F. (1980) Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. *Biochem. J.* 189, 467-473

55 4. Hirsch, C., Blom, D. and Ploegh, H.L. (2003) A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J.* 22, 1036-1046.

5. Saint-Pol, A., Cordogno, P. and Moore, S.E.H. (1999) Cytosol to lysosome transport of free polymannose-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 274, 13547-13555

60 6. Thomas, G.H. (2001) Disorders of glycoprotein degradation: α -mannosidosis, β -mannosidosis, fucosidosis and sialidosis in "The Metabolic Bases of Inherited Disease (Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., Vogelstein, B., eds.) 8th ed., pp. 3507-3533, McGraw-Hill, New York

65 7. Berg, T., Riise, H.M., Hanse, G.M., Malm, D., Tranebjarg, L., Tollersrud, O.K. and Nilssen, O. (1999) Spectrum of mutations in α -mannosidosis. *Am J. Hum. Genet.* 64, 77-88

8. Neufeld, E.F. (2004) Enzyme replacement therapy. In "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F.M., Walkley, S.V., eds.) pp. 327-338, Oxford University Press
9. Dobrenis, K. (2004) Cell-mediated delivery systems. In "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F.M., Walkley, S.V., eds.) pp. 339-380, Oxford University Press
10. Barton, N.W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., Grewal, R.P., Yu, K.-T. et al. (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1464-1470
11. Will, A., Cooper, A., Hatton, C., Sardhawalla, I.B., Evans, D.I.K. and Stevens, R.F. (1987) Bone marrow transplantation in the treatment of α -mannosidosis. *Arch. Dis. Childhood* 62, 1044-1049
12. Wall, D.A., Grange, D.K., Goulding, P., Danies, M., Luisiri, A. and Kotagal, S. (1998) Bone marrow transplantation for the treatment of α -mannosidase. *J. Pediatr.* 133, 282-285
13. Malm, P. (2004) Prologue. The doctor as parent. In "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F.M., Walkley S.U., eds.) pp. XXI-XXVII, Oxford University Press
14. Walkley, S.U., Thull, M.A., Dobrenis, K., Huang, M., March, A., Siegel, D.A. and Wurzelmann, S. (1994) Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2970-2974
15. Stinchi, S., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Coenen, R., Beccari, T., Orlaccio, A., von Figura, K., and Saftig, P. (1999) Targeted disruption of the lysosomal α -mannosidase gene results in mice resembling a mild form of human α -mannosidosis. *Hum. Mol. Gen.* 8, 1365-1372
16. Beccari, T., Apollini, M.G., Constanzi, E., Stinchi, S., Stirling, J.L., della Fazio, M.A., Servillo, G., Viola, M.P., and Orlaccio, A. (1997). Lysosomal alpha-mannosidases of mouse tissues: characteristics of the isoenzymes, and cloning and expression of a full-length cDNA. *Biochem J.* 327, 45-49
17. Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M., and Hauser, H. (1988). Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68, 213-219
18. Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., and von Figura, K. (1999). I-cell disease-like phenotype in mice deficient in mannose 6-phosphate receptors. *Transgenic Res.* 7, 473-483
19. Tollersrud, O.K., Berg, T., Healy, P., Evjen, G., Ramachandran, U. and Nilssen, O. (1997) Purification of bovine lysosomal α -mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause α -mannosidosis. *Eur. J. Biochem.* 246, 410-419
20. Pohlmann, R., Wendland, M., Boeker, C. and von Figura, K. (1995) The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 27311-27318
21. Wessel, D. and Flüggé, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143
22. Kakkis, E.D., Muenzer, J., and Tiller, G.E. (2001) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis. *N. Engl. J. Med.* 344, 182-188
23. Ghosh, P., Dahms, N.M. and Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature reviews* 4, 202-212
24. Pontow, S.E., Kery, V., and Stahl, P.D. (1992) Mannose receptor. *Int. Rev. Cytol.* 137B, 221-244
25. Ashwell, G. and Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.* 51, 531-554
26. Sands, M.S., Vogler, C.A., Ohlemiller, K.K., Roberts, M.S., Grubb, J.H., Levy, B. and Sly, W.S. (2001) Biodistribution, kinetics and efficacy of highly phosphorylated and non-phosphorylated β -glucuronidase in the murine model of mucopolysaccharidosis VII. *J. Biol. Chem.* 276, 41160-41165
27. Ioannu, Y.A., Zeidner, K.M., Gordon, R.E. and Desnick, R.J. (2001) Fabry disease: preclinical studies demonstrated the effectiveness of α -galactosidase replacement in enzyme-deficient mice. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 14-25

28. Vogler, C., Levy, B., Galvin, N.J., Thorpe, C., Sands, M.S., Barker, J.E., Barty, J., Birkenmeier, E.H., and Sly, W.S. (1999) Enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to β -glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy. *Pediatr. Res.* 45, 838-844
- 5 29. Yu, W.H., Zhao, K.W., Ryzantsev, S., Rozengurt, N., and Neufeld, E.F. (2000) Short term enzyme replacement in the murine model of Sanfilippo syndrome type B. *Mol. Genet. Metab.* 71, 753-780
30. Miranda, S.R., He, X., Simonara, C.M., Gatt, S., Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (2000) Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into Niemann-Pick disease mice leads to visceral, but not neurological correction of the pathophysiology. *FASEB J.* 14, 1988-1995
- 10 31. Du, H., Schiavi, S., Levine, M., Mishra, J., Heur, N., and Grabowski, G.A. (2001) Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1639-1648
- 15 32. Aebischer P, Goddard M, Signore AP, Timpson RL. 1994. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 126:151-158
33. Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. 1996. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2:696-699
- 20 34. Austin J, McAfee D, Armstrong D, O'Rourke M, Shearer L, Bachhawat B. 1964. Abnormal sulphatase activities in two human diseases (metachromatic leucodystrophy and gargoylism). *Biochem J* 93:15C-17C
- 25 35. Barth ML, Fensom A, Harris A. 1995. Identification of seven novel mutations associated with metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 6(2):170-176
36. Bayever E, Ladisch S, Philippart M, Brill N, Nuwer M, Sparkes RS, Feig SA. 1985. Bone-marrow transplantation for metachromatic leucodystrophy. *Lancet* 2(8453):471-473
- 30 37. Bradley RT, Manowitz P. 1988. Electrochemical determination of lysosomal alpha-mannosidase activity using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 173(1):33-38
38. Bräulke T, Hille A, Huttner WB, Hasilik A, von Figura K. 1987. Sulfated oligosaccharides in human lysosomal enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 143(1):178-185
- 35 39. Bräulke T, Tippmer S, Chao HJ, von Figura K. 1990. Insulin-like growth factors I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts. *J Biol Chem* 265(12):6650-6655
- 40 40. Deglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P. 1996. Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther* 7(17):2135-2146
41. Dierks T, Schmidt B, von Figura K. 1997. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22):11963-11968
- 45 42. Draghia R, Letourneur F, Drugan C, Manicom J, Blanchot C, Kahn A, Poenaru L, Caillaud C. 1997. Metachromatic leukodystrophy: identification of the first deletion in exon 1 and of nine novel point mutations in the lysosomal alpha-mannosidase gene. *Hum Mutat* 9(3):234-242
- 50 43. Draper RK, Fiskum GM, Edmond J. 1976. Purification, molecular weight, amino acid, and subunit composition of lysosomal alpha-mannosidase from human liver. *Arch Biochem Biophys* 177(2): 525-538
44. Dubois G, Turpin JC, Baumann N. 1975. Arylsulfatase isoenzymes in metachromatic leucodystrophy/detection of a new variant by electrophoresis improvement of quantitative assay. *Biomedicine* 23(3):116-119
- 55 45. Eto Y, Tokoro T, Liebaers I, Vámos E. 1982. Biochemical characterization of neonatal multiple sulfatase deficient (MSD) disorder cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 106(2):429-34
46. Farooqui AA. 1976. Purification and properties of human placenta arylsulphatase A. *Arch Int Physiol Biochim* 84(3):479-492
- 60 47. Farrell DF, MacMartin MP, Clark AF. 1979. Multiple molecular forms of lysosomal alpha-mannosidase in different forms of metachromatic leukodystrophy (alpha-mannosidosis). *Neurology* 29(1):16-20
- 65

48. Fujii T, Kobayashi T, Honke K, Gasa S, Ishikawa M, Shimizu T, Makita A. 1992. Proteolytic processing of human lysosomal lysosomal alpha-mannosidase. *Biochim Biophys Acta* 1122(1):93-98
- 5 49. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, Kappler J, Fluharty A, von Figura K. 1991. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Dev Neurosci* 13:222-227
50. Gieselmann V, Zlotogora J, Harris A, Wenger DA, Morris CP. 1994. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 4:233-42
- 10 51. Gieselmann V, Matzner U, Hess B, Lullmann-Rauch R, Coenen R, Hartmann D, D'Hooge R, DeDeyn P, Nagels G. 1998. Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *J Inherit Metab Dis* 21:564-574
52. Gniot-Szulzycka J. 1974. Some properties of highly purified arylsulphatase A from human placenta. *Acta Biochim Pol* 21(3):247-254
- 15 53. Gustavson KH, Hagberg B. 1971. The incidence and genetics of metachromatic leucodystrophy in northern Sweden. *Acta Paediatr Scand* 60(5):585-590
54. Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lullmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V. 1996. Phenotype of lysosomal alpha-mannosidase-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14821-14826
- 20 55. Hickey WF, Kimura H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239(4837):290-2
- 25 56. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28(2):254-60
57. Inoue H, Seyama Y, Yamashita S. 1986. Specific determination of lysosomal alpha-mannosidase activity. *Experientia* 15;42(1):33-35
- 30 58. James GT. 1979. Essential arginine residues in human liver lysosomal alpha-mannosidase. *Arch Biochem Biophys* 197(1):57-62
59. James GT, Thach AB, Klassen L, Austin JH. 1985. Purification of normal and mutant lysosomal alpha-mannosidase from human liver. *Life Sci* 37(25):2365-2371
- 35 60. Joss V, Rogers TR, Hugh-Jones K, Beilby B, Joshi R, Williamson S, Foroozanfar N, Riches P, Turner M, Benson PD, Hobbs JR. 1982 *Exp Hematol* 10, 52
- 40 61. Kelly BM, Yu CZ, Chang PL. 1989. Presence of a lysosomal enzyme, arylsulfatase-A, in the prelysosome-endosome compartments of human cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 48(1):71-78
62. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A. 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390(6661):687-690
- 45 63. Kreysing J, Polten A, Hess B, von Figura K, Menz K, Steiner F, Gieselmann V. 1994. Structure of the mouse lysosomal alpha-mannosidase gene and cDNA. *Genomics* 19(2):249-256
64. Kreysing J, von Figura K, Gieselmann V. 1990. Structure of the lysosomal alpha-mannosidase gene. *Eur J Biochem* 190. *Eur J Biochem*. 191(3): 627-631
- 50 65. Krivit W, Shapiro E, Kennedy W, Lipton M, Lockman L, Smith S, Summers CG, Wenger DA, Tsai MY, Ramsay NK, et al. 1990. Treatment of late infantile metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 322:28-32
- 55 66. Krivit W, Shapiro E, Hoogerbrugge PM, Moser HW. 1992. State of the art review. Bone marrow transplantation treatment for storage diseases. *Keystone*. January 23, 1992. *Bone Marrow Transplant* 10 Suppl 1:87-96
- 60 67. Laidler PM, Waheed A, Van Etten RL. 1985. Structural and immunochemical characterization of human urine lysosomal alpha-mannosidase purified by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 827(1):73-83
68. Lee GD, van Etten RL. 1975. Evidence of an essential histidine residue in rabbit liver aryl sulfatase A. *Arch Biochem Biophys* 171(2):424-434
- 65

69. Luijten JAFM, Van Der Heijden MCM, Rijkssen G, Staal GEJ. 1978. Purification and characterization of lysosomal alpha-mannosidase from human urine. *J Mol Med.* 1978, 3, 213
70. Manowitz P, Fine LV, Nora R, Chokroverty S, Nathan PE, Fazzaro JM. 1988. A new electrophoretic variant of lysosomal alpha-mannosidase. *Biochem Med Metab Biol* 39(1):117-120
71. Mould DL, Dawson AM, Rennie JC. 1970. Very early replication of scrapie in lymphocytic tissue. *Nature* 228(273):779-780
72. Ohashi T, Watabe K, Sato Y, Saito I, Barranger JA, Matalon R, Eto Y. 1996. Gene therapy for metachromatic leukodystrophy. *Acta Paediatr Jpn* 38(2):193-201
73. Oya Y, Nakayasu H, Fujita N, Suzuki K, Suzuki K. 1998. Pathological study of mice with total deficiency of sphingolipid activator proteins (SAP knockout mice). *Acta Neuropathol (Berl)* 96(1):29-40
74. Poretz RD, Yang RS, Canas B, Lackland H, Stein S, Manowitz P. 1992. The structural basis for the electrophoretic isoforms of normal and variant human platelet arylsulphatase A. *Biochem J* 287 (Pt 3):979-983
75. Porter MT, Fluharty AL, Kihara H. 1971. Correction of abnormal cerebroside sulfate metabolism in cultured metachromatic leukodystrophy fibroblasts. *Science* 171,172, 1263-1265
76. Sangalli A, Taveggia C, Salviati A, Wrabetz L, Bordignon C, Severini GM. 1998. Transduced fibroblasts and metachromatic leukodystrophy lymphocytes transfer lysosomal alpha-mannosidase to myelinating glia and deficient cells in vitro. *Hum Gene Ther* 9(14):2111-2119
77. Sarafian TA, Tsay KK, Jackson WE, Fluharty AL, Kihara H. 1985. Studies on the charge isomers of lysosomal alpha-mannosidase. *Biochem Med* 33(3):372-380
78. Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K. 1995. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82(2):271-278
79. Selmer T, Hallmann A, Schmidt B, Sumper M, von Figura K. 1996. The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in arylsulfatase from *Volvox carteri*. *Eur J Biochem* 238:341-345
80. Shapira E, Nadler HL. 1975. Purification and some properties of soluble human liver arylsulfatases. *Arch Biochem Biophys* 170(1):179-187
81. Shapiro EG, Lockman LA, Balthazor M, Krivit W. 1995. Neuropsychological outcomes of several storage diseases with and without bone marrow transplantation. *J Inher Metab Dis* 18:413-429
82. Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'Brien JS, von Figura K. 1989. Cloning and expression of human lysosomal alpha-mannosidase. *J Biol Chem* 264:1252-1259
83. Stevens RL, Fluharty AL, Skokut MH, Kihara H. 1975. Purification and properties of arylsulfatase. A from human urine. *J Biol Chem* 250(7):2495-2501
84. Stevens RL, Fluharty AL, Killgrove AR, Kihara H. 1976. Microheterogeneity of lysosomal alpha-mannosidase from human tissues. *Biochim Biophys Acta* 445(3):661-671
85. von Figura K, Steckel F, Conary J, Hasilik A, Shaw E. 1986. Heterogeneity in late-onset metachromatic leukodystrophy. Effect of inhibitors of cysteine proteinases. *Am J Hum Genet*, 39, 371-382
86. Waheed A, Hasilik A, von Figura K. 1982. Synthesis and processing of lysosomal alpha-mannosidase in human skin fibroblasts. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363(4):425-430
87. Waheed A, van Etten RL. 1985. Phosphorylation and sulfation of lysosomal alpha-mannosidase accompanies biosynthesis of the enzyme in normal and carcinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta* 847(1): 53-61
88. WO 02/99092 A (Fogh Jens; Hemebiotech AS (DK); Andersson Claes (SE); Weigelt Cecilia) 12 December 2002
89. Berg Thomas et al.: "Purification and characterization of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase", *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 73, no. 1, April 2001, pages 18-29

Listado de secuencias

5 <110> Jens Fogh
 Claes Anderson
 Cecilia Weigelt
 Diego Prieto Roces
 Kurt von Figura
 Meher Irani
 10 <120> Uso de alfa-manosidasa para la corrección del almacenamiento lisosómico anormal en el CNS
 <130> 36564PC01
 15 <150> PA200400528
 <151> 2004-04-01
 <150> US 60/558,108
 <151> 2004-04-01
 20 <160> 2
 <170> FastSEQ para Versión Windows 4.0
 25 <210> 1
 <211> 1011
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 30 <400> 1
 Met Gly Ala Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Val Cys Ala Arg Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Asp Ser Ala Gly Pro Trp Thr Met Ser Arg Ala Leu Arg Pro Pro Leu
 20 25 30
 Pro Pro Leu Cys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Arg
 35 40 45
 Ala Gly Gly Tyr Glu Thr Cys Pro Thr Val Gln Pro Asn Met Leu Asn
 50 55 60
 Val His Leu Leu Pro His Thr His Asp Asp Val Gly Trp Leu Lys Thr
 65 70 75 80
 Val Asp Gln Tyr Phe Tyr Gly Ile Lys Asn Asp Ile Gln His Ala Gly
 85 90 95

ES 2 672 646 T3

Val	Gln	Tyr	Ile	Leu	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	
			100						105						110	
Thr	Arg	Arg	Phe	Ile	Tyr	Val	Glu	Ile	Ala	Phe	Phe	Ser	Arg	Trp	Trp	
			115						120						125	
His	Gln	Gln	Thr	Asn	Ala	Thr	Gln	Glu	Val	Val	Arg	Asp	Leu	Val	Arg	
			130						135						140	
Gln	Gly	Arg	Leu	Glu	Phe	Ala	Asn	Gly	Gly	Trp	Val	Met	Asn	Asp	Glu	
145						150						155			160	
Ala	Ala	Thr	His	Tyr	Gly	Ala	Ile	Val	Asp	Gln	Met	Thr	Leu	Gly	Leu	
			165						170						175	
Arg	Phe	Leu	Glu	Asp	Thr	Phe	Gly	Asn	Asp	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Ala	
			180						185						190	
Trp	His	Ile	Asp	Pro	Phe	Gly	His	Ser	Arg	Glu	Gln	Ala	Ser	Leu	Phe	
			195						200						205	
Ala	Gln	Met	Gly	Phe	Asp	Gly	Phe	Phe	Phe	Gly	Arg	Leu	Asp	Tyr	Gln	
210						215						220				
Asp	Lys	Trp	Val	Arg	Met	Gln	Lys	Leu	Glu	Met	Glu	Gln	Val	Trp	Arg	
225						230						235			240	
Ala	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Pro	Pro	Thr	Ala	Asp	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	
			245						250						255	
Leu	Pro	Asn	Gly	Tyr	Asn	Pro	Pro	Arg	Asn	Leu	Cys	Trp	Asp	Val	Leu	
			260						265						270	
Cys	Val	Asp	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Asp	Pro	Arg	Ser	Pro	Glu	Tyr	Asn	
275						280						285				
Ala	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Tyr	Phe	Leu	Asn	Val	Ala	Thr	Ala	Gln	Gly	
290						295						300				
Arg	Tyr	Tyr	Arg	Thr	Asn	His	Thr	Val	Met	Thr	Met	Gly	Ser	Asp	Phe	
305						310						315			320	
Gln	Tyr	Glu	Asn	Ala	Asn	Met	Trp	Phe	Lys	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Ile	
			325						330						335	
Arg	Leu	Val	Asn	Ala	Gln	Gln	Ala	Lys	Gly	Ser	Ser	Val	His	Val	Leu	
			340						345						350	
Tyr	Ser	Thr	Pro	Ala	Cys	Tyr	Leu	Trp	Glu	Leu	Asn	Lys	Ala	Asn	Leu	
			355						360						365	
Thr	Trp	Ser	Val	Lys	His	Asp	Asp	Phe	Phe	Pro	Tyr	Ala	Asp	Gly	Pro	
370						375						380				
His	Gln	Phe	Trp	Thr	Gly	Tyr	Phe	Ser	Ser	Arg	Pro	Ala	Leu	Lys	Arg	
385						390						395			400	
Tyr	Glu	Arg	Leu	Ser	Tyr	Asn	Phe	Leu	Gln	Val	Cys	Asn	Gln	Leu	Glu	
			405						410						415	
Ala	Leu	Val	Gly	Leu	Ala	Ala	Asn	Val	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asp	
420						425						430				
Ser	Ala	Pro	Leu	Asn	Glu	Ala	Met	Ala	Val	Leu	Gln	His	His	Asp	Ala	
435						440						445				
Val	Ser	Gly	Thr	Ser	Arg	Gln	His	Val	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ala	Arg	Gln	

ES 2 672 646 T3

450		455		460
Leu Ala Ala Gly Trp Gly Pro Cys Glu Val Leu Leu Ser Asn Ala Leu				
465		470		475
Ala Arg Leu Arg Gly Phe Lys Asp His Phe Thr Phe Cys Gln Gln Leu				
	485		490	495
Asn Ile Ser Ile Cys Pro Leu Ser Gln Thr Ala Ala Arg Phe Gln Val				
	500		505	510
Ile Val Tyr Asn Pro Leu Gly Arg Lys Val Asn Trp Met Val Arg Leu				
	515		520	525
Pro Val Ser Glu Gly Val Phe Val Val Lys Asp Pro Asn Gly Arg Thr				
	530		535	540
Val Pro Ser Asp Val Val Ile Phe Pro Ser Ser Asp Ser Gln Ala His				
545		550		555
Pro Pro Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Gly Phe Ser				
	565		570	575
Thr Tyr Ser Val Ala Gln Val Pro Arg Trp Lys Pro Gln Ala Arg Ala				
	580		585	590
Pro Gln Pro Ile Pro Arg Arg Ser Trp Ser Pro Ala Leu Thr Ile Glu				
	595		600	605
Asn Glu His Ile Arg Ala Thr Phe Asp Pro Asp Thr Gly Leu Leu Met				
610		615		620
Glu Ile Met Asn Met Asn Gln Gln Leu Leu Leu Pro Val Arg Gln Thr				
625		630		635
Phe Phe Trp Tyr Asn Ala Ser Ile Gly Asp Asn Glu Ser Asp Gln Ala				
	645		650	655
Ser Gly Ala Tyr Ile Phe Arg Pro Asn Gln Gln Lys Pro Leu Pro Val				
	660		665	670
Ser Arg Trp Ala Gln Ile His Leu Val Lys Thr Pro Leu Val Gln Glu				
	675		680	685
Val His Gln Asn Phe Ser Ala Trp Cys Ser Gln Val Val Arg Leu Tyr				
690		695		700
Pro Gly Gln Arg His Leu Glu Leu Glu Trp Ser Val Gly Pro Ile Pro				
705		710		715
Val Gly Asp Thr Trp Gly Lys Glu Val Ile Ser Arg Phe Asp Thr Pro				
	725		730	735
Leu Glu Thr Lys Gly Arg Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Gly Arg Glu Ile				
	740		745	750
Leu Glu Arg Arg Arg Asp Tyr Arg Pro Thr Trp Lys Leu Asn Gln Thr				
	755		760	765
Glu Pro Val Ala Gly Asn Tyr Tyr Pro Val Asn Thr Arg Ile Tyr Ile				
770		775		780
Thr Asp Gly Asn Met Gln Leu Thr Val Leu Thr Asp Arg Ser Gln Gly				
785		790		795
Gly Ser Ser Leu Arg Asp Gly Ser Leu Glu Leu Met Val His Arg Arg				
	805		810	815

ES 2 672 646 T3

Leu Leu Lys Asp Asp Gly Arg Gly Val Ser Glu Pro Leu Met Glu Asn
 820 825 830
 Gly Ser Gly Ala Trp Val Arg Gly Arg His Leu Val Leu Leu Asp Thr
 835 840 845
 Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gly His Arg Leu Leu Ala Glu Gln Glu Val
 850 855 860
 Leu Ala Pro Gln Val Val Leu Ala Pro Gly Gly Gly Ala Ala Tyr Asn
 865 870 875 880
 Leu Gly Ala Pro Pro Arg Thr Gln Phe Ser Gly Leu Arg Arg Asp Leu
 885 890 895
 Pro Pro Ser Val His Leu Leu Thr Leu Ala Ser Trp Gly Pro Glu Met
 900 905 910
 Val Leu Leu Arg Leu Glu His Gln Phe Ala Val Gly Glu Asp Ser Gly
 915 920 925
 Arg Asn Leu Ser Ala Pro Val Thr Leu Asn Leu Arg Asp Leu Phe Ser
 930 935 940
 Thr Phe Thr Ile Thr Arg Leu Gln Glu Thr Thr Leu Val Ala Asn Gln
 945 950 955 960
 Leu Arg Glu Ala Ala Ser Arg Leu Lys Trp Thr Thr Asn Thr Gly Pro
 965 970 975
 Thr Pro His Gln Thr Pro Tyr Gln Leu Asp Pro Ala Asn Ile Thr Leu
 980 985 990
 Glu Pro Met Glu Ile Arg Thr Phe Leu Ala Ser Val Gln Trp Lys Glu
 995 1000 1005
 Val Asp Gly
 1010

<210> 2

<211> 8079

5 <212> ADN

<213 > Secuencia Artificial

<220>

<223> plásmido de expresión pLamanExp1

10

<400> 2

ES 2 672 646 T3

```

agatcttcaa tattggccat tagccatatt attcattggt tatatagcat aaatcaatat 60
tggctattgg ccattgcata cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc 120
atgtccaata tgaccgccat gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt 420
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc 480

```

ES 2 672 646 T3

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca 540
gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 600
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660
caactgcgat cgcccgcgcc gttgacgcaa atggggcggtta ggcgtgtacg gtgggaggtc 720
tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcacta gaagctttat tgcggtagtt 780
tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagt gcttctgaca caacagtcctc gaacttaagc 840
tgcagtgact ctcttaaggt agccttgca gaggttggctg tgaggcactg ggcaggttaag 900
tatcaagggtt acaagacagg ttttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag 960
aagactcttg cgtttctgat aggcacctat tgggtcttact gacatccact ttgcctttct 1020
ctccacaggt gtccactccc agttcaatta cagctcttaa ggctagagta ctttaatacga 1080
ctcactatag gctagcctcg agaattcgcc gccatgggcg cctacgcgcg ggcttcgggg 1140
gtctgcgctc gaggtgcct ggactcagca ggccctgga ccatgtcccg cgccctgcgg 1200
ccaccgctcc cgctctctg ctttttctt ttgttgctgg cggctgccgg tgctcgggcc 1260
gggggatacg agacatgccc cacagtgcag ccgaacatgc tgaacgtgca cctgtgcct 1320
cacacacatg atgacgtggg ctggctcaaa accgtggacc agtactttta tggaatcaag 1380
aatgacatcc agcacgccgg tgtgcagtac atcctggact cggtcactc tgccttgctg 1440
gcagatccca ccgctcgctt catttacgtg gagattgcct tcttctcccg ttggtggcac 1500
cagcagacaa atgccacaca ggaagtcgtg cgagacctg tgcgccagg ggcctggag 1560
ttcgccaatg gtggctgggt gatgaacgat gaggcagcca cccactacg tgccatcggt 1620
gaccagatga cacttgggct gcgctttctg gaggacacat ttggcaatga tgggcgaccc 1680
cgtgtggcct ggcacattga ccccttcggc cactctcggg agcaggcctc gctgtttgcg 1740
cagatgggct tcgacggctt cttctttggg cgcttgatt atcaagataa gtgggtacgg 1800
atgcagaagc tggagatgga gcaggtgtgg cgggccagca ccagcctgaa gccccgacc 1860
goggacctct tcaactggtg gcttcccaat gggtacaacc cgccaaggaa tctgtgctgg 1920
gatgtgctgt gtgtcgatca gccgtgggtg gaggacctc gcagccccga gtacaacgcc 1980
aaggagctgg tcgattactt cctaaatgtg gccactgcc agggccggta ttaccgcacc 2040
aaccacactg tgatgaccat gggctcggac ttccaatatg agaatgcaa catgtggttc 2100
aagaaccttg acaagctcat ccggctggta aatgcgcagc aggcaaaagg aagcagtgtc 2160
catgttctct actccacccc cgcttggtac ctctgggagc tgaacaaggc caacctcacc 2220
tggtcagtga aacatgacga cttcttccct tacgcggatg gccccacca gttctggacc 2280
ggttactttt ccagtcggcc ggccctcaaa cgctacgagc gcctcagcta caacttcctg 2340
caggtgtgca accagctgga ggcgtgggtg ggccctggcg ccaacgtggg accctatggc 2400
tccggagaca gtgcaccctt caatgaggcg atggctgtgc tccagcatca cgacgccgtc 2460
agcggcacct ccgcccagca cgtggccaac gactacgcgc gccagcttgc ggcaggtgtg 2520
gggccttgcg aggttcttct gagcaacgcg ctggcgcggc tcagaggctt caaagatcac 2580
ttcacctttt gccaacagct aaacatcagc atctgcccgc tcagccagac ggcggcgcg 2640
ttccaggtca tcgtttataa tcccctgggg cggaagggtga attggatggt acggctgccg 2700
gtcagcgaag gcgttttctg tgtgaaggac cccaatggca ggacagtgcc cagcgatgtg 2760
gtaatatatt ccagctcaga cagccaggcg caccctccgg agctgctgtt ctcagcctca 2820
ctgcccgcgc tgggcttcag cacctattca gtagccagg tgctcgtctg gaagccccag 2880
gcccgcgcac cacagcccat cccagaaga tcctggtccc ctgctttaac catcgaaaat 2940
gagcacatcc gggcaacggt tgatcctgac acagggctgt tgatggagat tatgaacatg 3000
aatcagcaac tcctgctgcc tgttcgccag accttcttct ggtacaacgc cagtataagg 3060
gacaacgaaa gtgaccaggc ctcaggtgcc tacatcttca gacccaacca acagaaaccg 3120
ctgcctgtga gccgtgggc tcagatccac ctggtgaaga cacccttggg gcaggagggtg 3180

ES 2 672 646 T3

caccagaact tctcagcttg gtgttcccag gtggttcgcc tgtaccacagg acagcggcac 3240
ctggagctag agtgggtcgtt ggggcccagata cctgtgggag acacctgggg gaaggaggtc 3300
atcagccgtt ttgacacacc gctggagaca aaggagcgtt tctacacaga cagcaatggc 3360
cgggagatcc tggagaggag gcgggattat cgacccacct ggaaactgaa ccagacggag 3420
cccgtggcag gaaactacta tccagtcaac acccggtattt acatcacgga tggaaacatg 3480
cagctgactg tgctgactga ccgctcccag gggggcagca gcctgagaga tggctcgctg 3540
gagctcatgg tgcaccgaag gctgctgaag gacgatggac gcggagtatc ggagccacta 3600
atggagaacg ggtcgggggc gtgggtgcga gggcgccacc tgggtgctgct ggacacagcc 3660
caggctgcag ccgcccagaca ccggctcctg gcggagcagg aggtcctggc ccctcaggtg 3720
gtgctggccc cgggtggcgg cgccgcctac aatctcgggg ctctcccgcg cagcagttc 3780
tcagggctgc gcagggacct gccgccctcg gtgcacctgc tcacgctggc cagctggggc 3840
cccgaaatgg tgctgctgct cttggagcac cagtttgccg taggagagga ttccggacct 3900
aacctgagcg cccccgttac cttgaacttg agggacctgt tctccacctt caccatcacc 3960
cgctgcagg agaccacgct ggtggccaac cagctccgcg aggcagcctc caggctcaag 4020
tggacaacaa acacaggccc cacaccccac caaactccgt accagctgga cccggccaac 4080
atcacgctgg aacctatgga aatccgcaact ttcctggcct cagttcaatg gaaggaggtg 4140
gatggttagg tctgctggga tgggccctct agagtcgacc cgggcggccg cttcccttta 4200
gtgaggggta atgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac 4260
aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 4320
tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcatte attttatgtt 4380
tcaggttcag ggggagatgt gggagggttt ttaaagcaag taaaacctct acaaagtgg 4440
taaaatccga taaggatcga tccgggctgg cgtaatagcg aaggagcccg caccgatcgc 4500
ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggacgc gccctgtagc ggcgcatata 4560
gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc 4620
ccgctccttt cgctttcttc ccttcccttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag 4680
ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagagc tttacggcac ctgcaccgca 4740
aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 4800
gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa 4860
cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcgccct 4920
attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt 4980
gtgtcagtta ggggtgtgaa agtcccacag ctcccacagg aggcagaagt atgcaaagca 5040
tgcatctcaa ttagtcagca accagggtgt gaaagtcccc aggtcccca gcaggcagaa 5100
gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca 5160
tcccgcctt aactccgccc agttccgccc atttccgccc ccatggtga ctaatttttt 5220
ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag 5280
gcttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg atggttcgac cattgaaactg 5340
catcgctgcc gtgtcccaaa atatggggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc 5400
gctcaggaac gagttcaagt acttccaaag aatgaccaca acctcttcag tggaggttaa 5460
acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac ctggttctcc attcctgaga agaatcgacc 5520
tttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc aaagaaccac cagaggagc 5580
tcattttctt gccaaaagt tggatgatgc cttaagactt attgaacaac cggaattggc 5640
aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg aggcagttct gtttaccagg aagccatgaa 5700
tcaaccaggc caccttagac tctttgtgac aaggatcatg caggaatttg aaagtgcac 5760
gtttttccca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc ccagaatacc caggcgtcct 5820
ctctgaggtc caggagggaaa aaggcatcaa gtataagttt gaagtctacg agaagaaaga 5880

ES 2 672 646 T3

```

ctaattcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcc a tcacgatggc cgcaataaaa 5940
tatcttttatt ttcattacat ctgtgtgttg gttttttgtg tgaatcgata gcgataagga 6000
tccgcgtatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc 6060
gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 6120
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 6180
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga 6240
taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta 6300
tttgttttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 6360
aaatgcttca ataataattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 6420
ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga 6480
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 6540
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 6600
ttaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 6660
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 6720
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 6780
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 6840
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 6900
ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 6960
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 7020
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattg 7080
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 7140
atggtaagcc ctcccgatc gtagtattct acacgacggg gagtccaggca actatggatg 7200
aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag 7260
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 7320
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt 7380
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc 7440
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc 7500
cggatcaaga gotaccaact ctttttccga aggttaactg cttcagcaga gcgcagatac 7560
caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 7620
cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgetgccagt ggcgataagt 7680
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 7740
gaacgggggg ttctgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 7800
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga agggagaaaag gcggacaggt 7860
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg 7920
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 7980
gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 8040
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tggctcgac 8079

```

REIVINDICACIONES

1. Uso de una alfa-manosidasa lisosómica para la preparación de un medicamento para el tratamiento de alfa-manosidosis, en el que dicho medicamento debe administrarse por administración intravenosa.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento debe administrarse por infusión, o inyección intravenosa repetida en una frecuencia correspondiente a 1 a 5 inyecciones diarias, 1 a 5 inyecciones por semana, 1 a 5 inyecciones cada 2 semanas o 1 a 5 inyecciones cada mes.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho medicamento no comprende un componente con una capacidad conocida para dirigirse a las células dentro del sistema nervioso central.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la alfa-manosidasa lisosómica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho medicamento debe administrarse a una frecuencia correspondiente a 1-5 inyecciones por semana.
6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho medicamento no comprende un componente para el direccionamiento de células dentro del sistema nervioso central y no comprende un componente con la capacidad de actuar como vehículo para el paso sobre la barrera hematoencefálica.
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho medicamento se administra en una cantidad, que está dentro del intervalo de 5 a 300 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal del sujeto a tratar.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho medicamento se administra en una cantidad, que está dentro del intervalo de 20 a 100 mU de alfa-manosidasa lisosómica por gramo de peso corporal del sujeto a tratar.
9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una fracción de dicha alfa-manosidasa lisosómica consiste en alfa-manosidasa lisosómica que tiene uno o más oligosacáridos unidos a N que llevan residuos de manosa-6-fosfato.
10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una fracción correspondiente a desde 1 a 75% de la actividad de una preparación de alfa-manosidasa lisosómica se enlaza al receptor de manosa-6-fosfato.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha fracción corresponde a desde 10 a 50% de la actividad de una preparación de alfa-manosidasa lisosómica.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha fracción corresponde a desde 20 a 40% de la actividad de una preparación de alfa-manosidasa lisosómica.
13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha alfa-manosidasa lisosómica es una enzima recombinante.
14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha alfa-manosidasa lisosómica se produce en un sistema de células de mamífero.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho sistema celular de mamífero es una línea celular CHO.

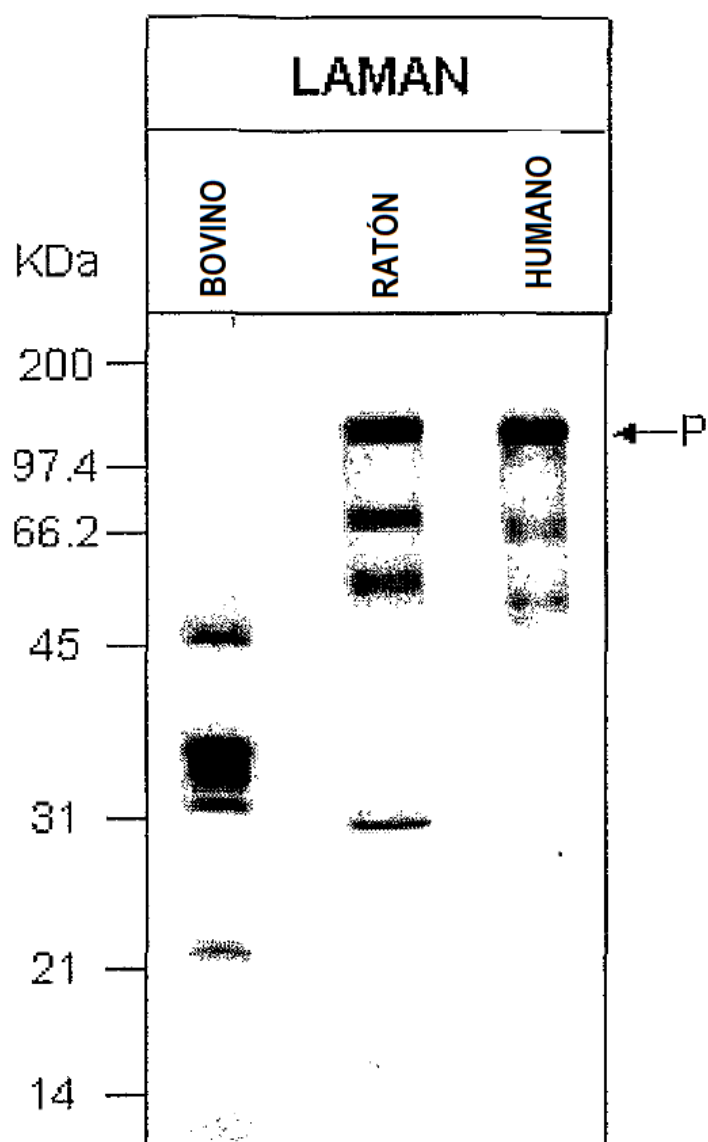


Fig. 1

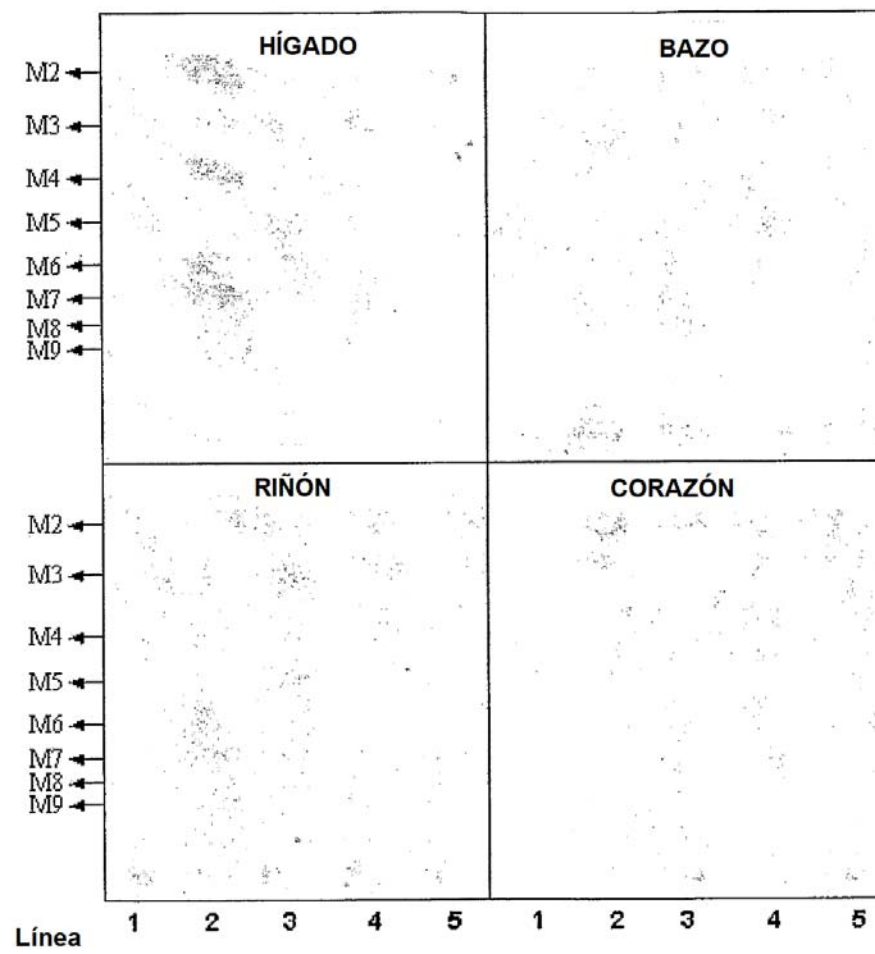


Fig. 2

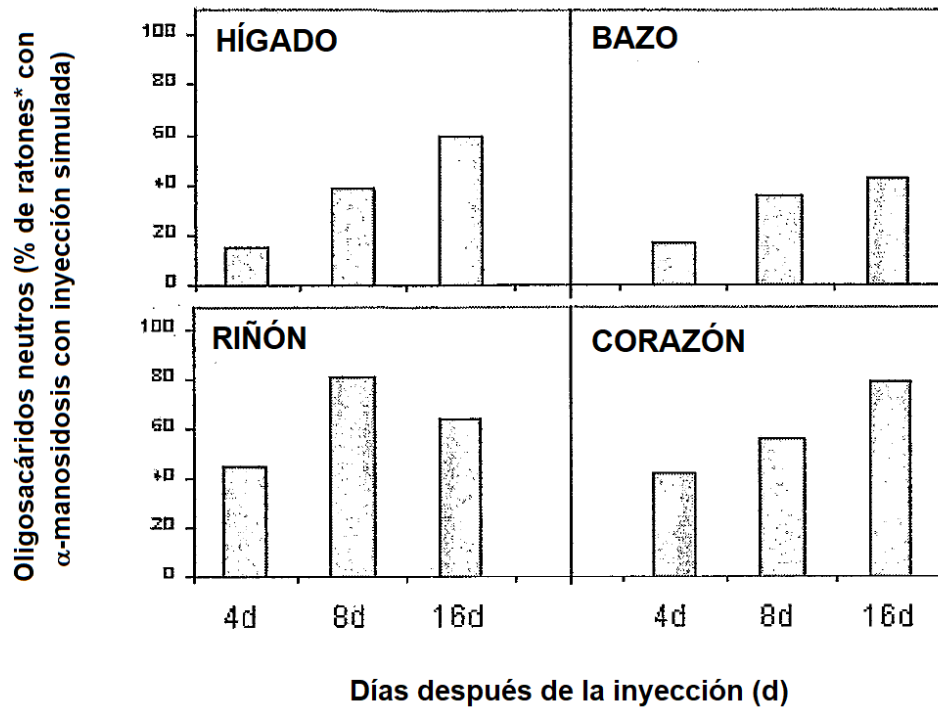


Fig. 3

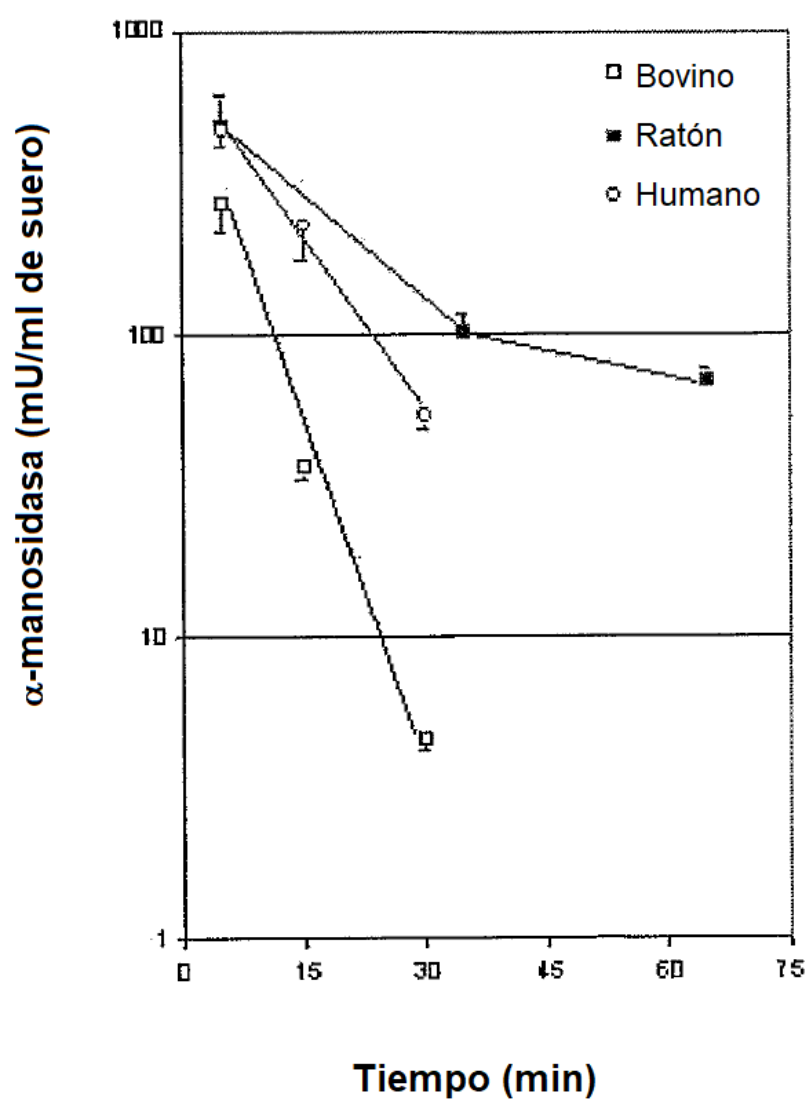


Fig. 4

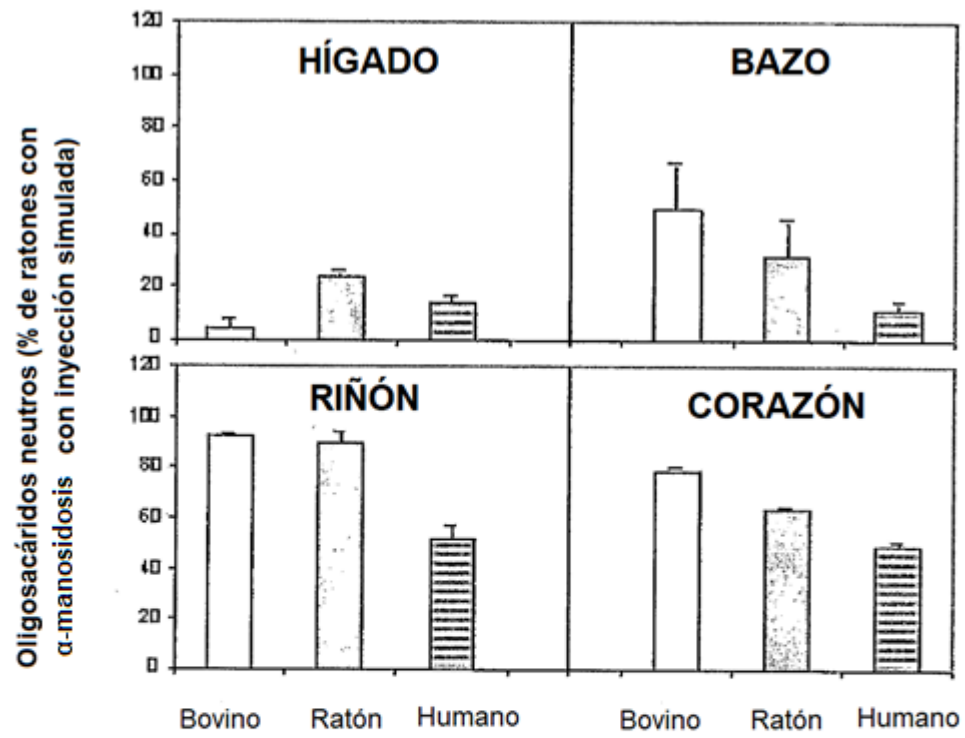


Fig. 5

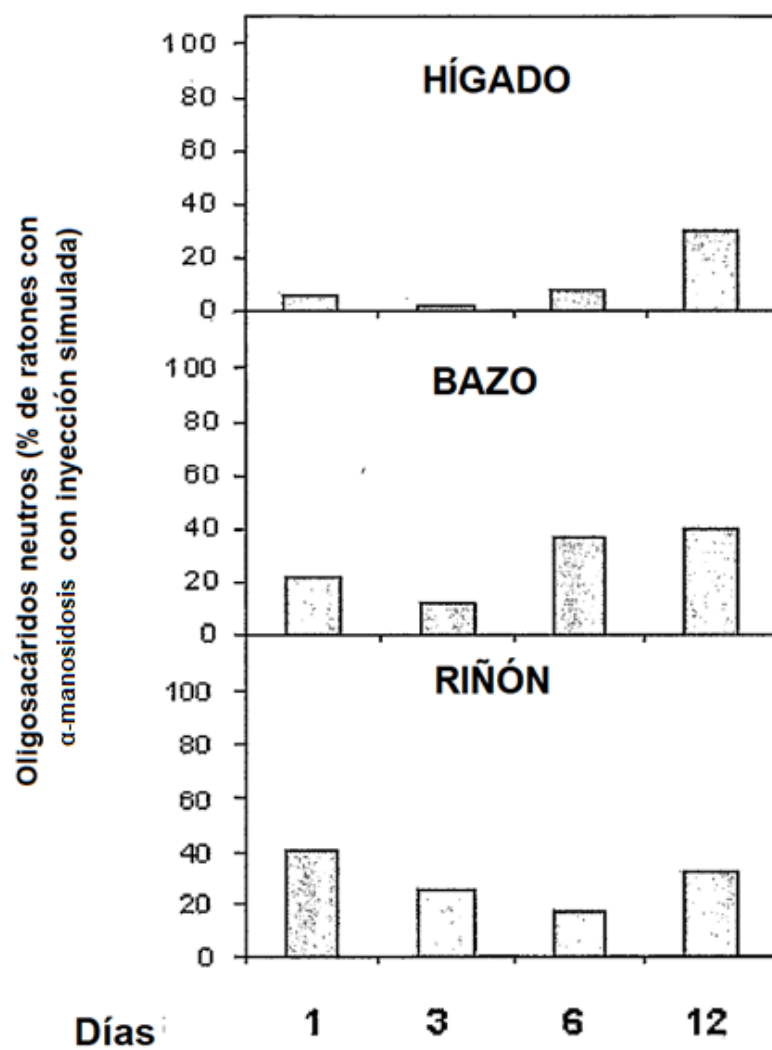


Fig. 6

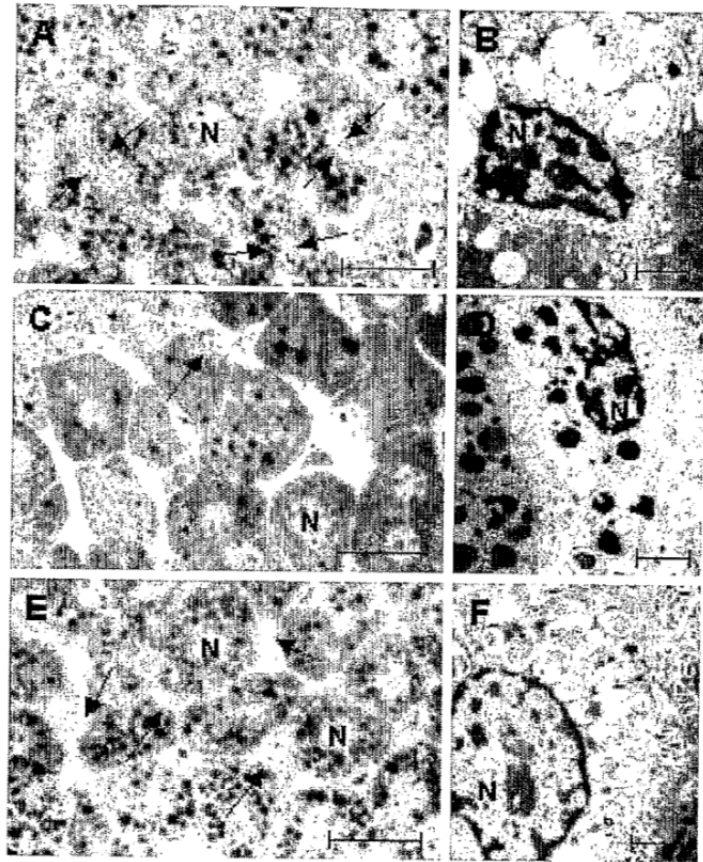


Fig. 7

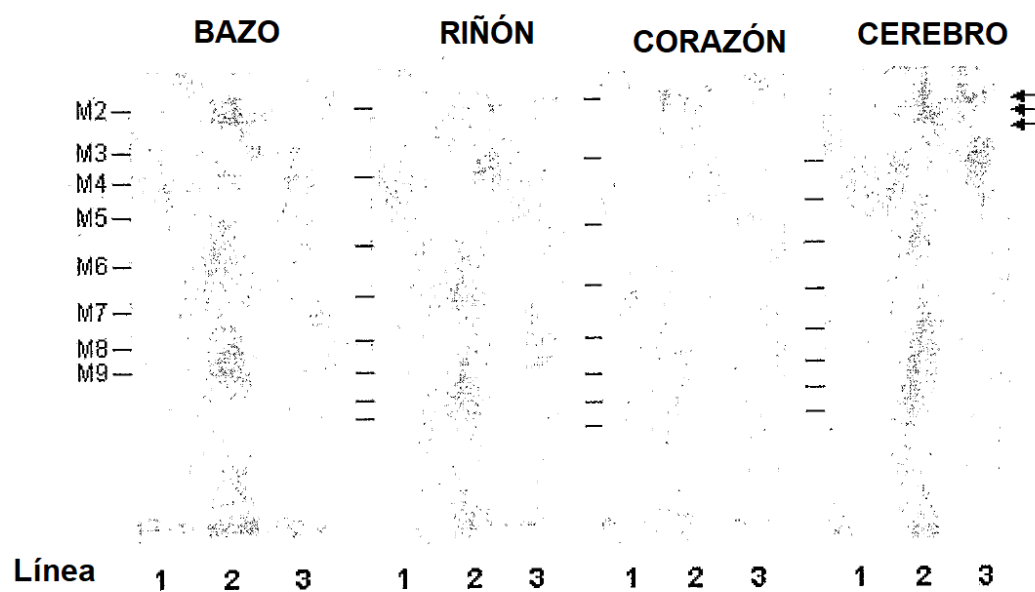


Fig. 8

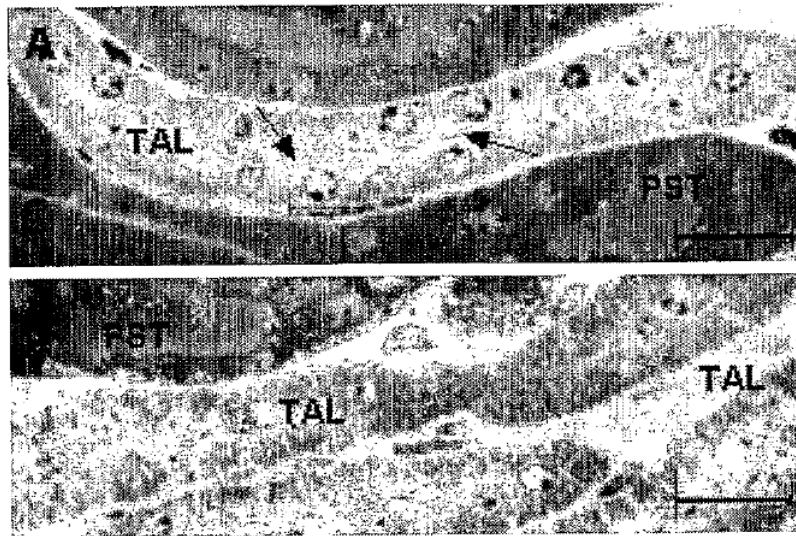


Fig. 9

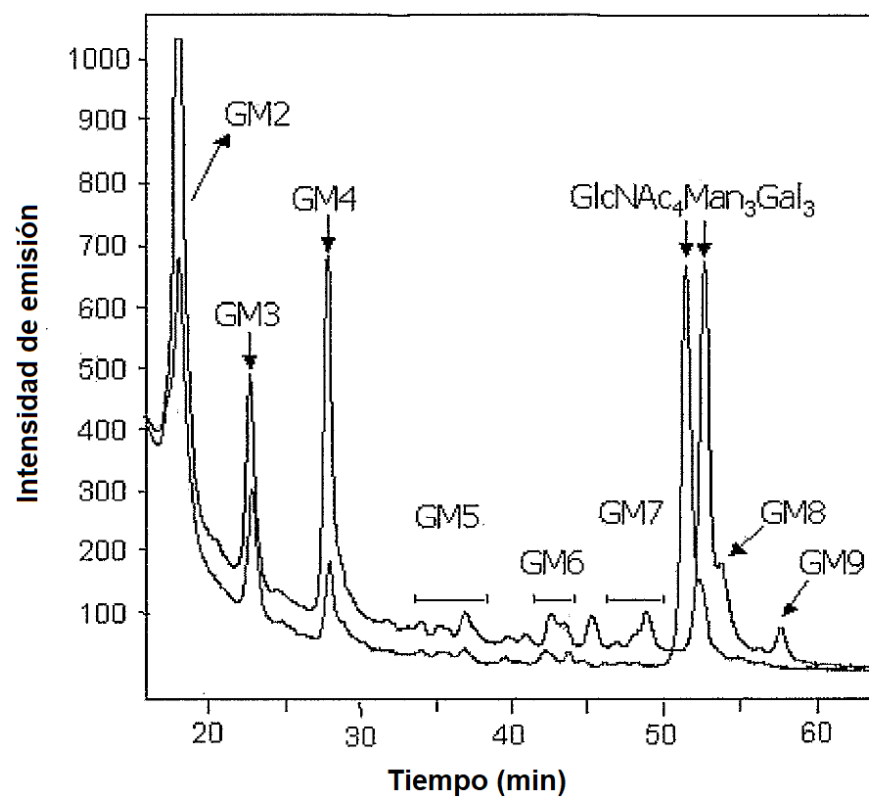


Fig. 10