

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 415**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2011 PCT/US2011/061862**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12071422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011 E 11843849 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2643468**

54 Título: **Nuevas secuencias señal para mejorar las expresiones de proteínas y la secreción de enzimas recombinantes y de otras proteínas**

30 Prioridad:

**22.11.2010 US 415926 P**

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

**25.10.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DO, HUNG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 687 415 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

Nuevas secuencias señal para mejorar las expresiones de proteínas y la secreción de enzimas recombinantes y de otras proteínas

## REFERENCIA CRUZADA DE SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Se reivindica la prioridad para la Solicitud de Patente U.S. provisional nº 61/415.926, presentada el 22 de noviembre de 2010, que se incorpora aquí como referencia y en su totalidad.

## CAMPO TÉCNICO

La expresión y secreción de enzimas recombinantes y de otras proteínas para usos terapéuticos y otros usos.

## ANTECEDENTES

- 10 En eucariotas, la síntesis de proteínas para casi todas las proteínas comienza en el citoplasma vía complejos megaproteínicos denominados ribosomas. Diversas proteínas completan su síntesis y se pliegan en el citoplasma, y permanecen allí, donde funcionan. Sin embargo, muchas otras son exportadas fuera del citoplasma y al retículo endoplasmático (RE), donde adquieren las modificaciones post-traduccionales necesarias (por ejemplo, enlaces de disulfuro, glicosilación, etc.) para lograr su estructura proteica apropiada y actividad biológica antes de exportarlas a sus localizaciones celulares pretendidas (por ejemplo, proteínas de Golgi, peroxisómicas y lisosómicas) o a la superficie celular (por ejemplo, receptores, canales de iones, etc.), o ser segregadas fuera de las células (por ejemplo, anticuerpos, factores de coagulación, hormonas, etc.). Las proteínas destinadas a exportarlas fuera del citoplasma se distinguen de las proteínas citoplásmicas por un elemento proteico especializado en el término amino (N-) denominado la secuencia señal.

- 20 Las secuencias señal (también denominadas péptidos señal) no tienen ninguna secuencia de aminoácidos de consenso o longitud, pero típicamente comprenden los 15-40 restos iniciales en el término N con 7-20 restos de aminoácidos hidrófobos contiguos que forman una estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal que a menudo está flanqueada por restos cargados. Las secuencias señal se identifican en el citoplasma por un complejo de proteína:ARN de múltiples subunidades especializado, denominado la partícula de reconocimiento de señal (SRP), que dirige estas proteínas nacientes hacia poros especializados dentro de la membrana del RE, denominados translocones, en los que estas proteínas son transportadas a través de la membrana del RE a la luz del RE - un proceso conocido como translocación proteica.

- 30 La translocación proteica se produce concurrentemente durante la síntesis de proteínas (es decir, cotraduccionalmente) en mamíferos, mientras que en otras eucariotas (por ejemplo, levadura) este proceso puede ser co- o post-traduccional. La translocación proteica mediada por secuencias señal se utiliza también en bacterias para dirigir proteínas fuera del citoplasma y al periplasma. En mamíferos, las secuencias señal se identifican mediante SRP a medida que emergen de ribosomas que pausan temporalmente la traducción de proteínas para permitir dirigir todo el complejo de SRP-proteína naciente-ribosoma hacia translocones vía el receptor de SRP asociado. La síntesis proteica se reanuda después de que se libera la SRP y el complejo de ribosoma-proteína naciente está apropiadamente alojado en el translocón.

- 40 La mayoría de los tratamientos enzimáticos y otros tratamientos proteicos se producen mediante tecnología recombinante que se diseña para segregar estas proteínas recombinantes fuera de las células y en el cultivo celular para simplificar la purificación aguas abajo. Estas enzimas y otras proteínas recombinantes deben utilizar por lo tanto secuencias señal y esta misma ruta celular para la secreción. La producción a alto nivel de estas proteínas requiere por lo tanto secuencias señal que pueden mediar la selección eficiente del RE y la translocación proteica a través de la membrana del RE. Sin embargo, las secuencias señal no son equivalentes para facilitar la selección del RE y la translocación. Se cree que la identificación de secuencias señal mediante SRP se produce rápida y eficientemente, pero las etapas subsiguientes de selección del RE y translocación son muy dispares entre proteínas. Debido a que las secuencias señal son reconocidas dos veces, primero por SRP para dirigir el complejo de proteína naciente-ribosoma hacia el RE, y subsiguientemente mediante proteínas translocones (es decir, proteínas Sec61) y otras proteínas del RE asociadas a translocones, para iniciar la translocación, ambos son sitios potenciales para la regulación. Se ha mostrado que esta última etapa es mucho más restrictiva y menos eficiente, y de este modo, es un cuello de botella importante en este proceso. Sorprendentemente, la mayoría de secuencias señal son intrínsecamente ineficientes para facilitar la translocación proteica. Consiguientemente, muchos complejos de proteína naciente-ribosoma dirigidos al RE se disocian de la membrana del RE y la síntesis proteica se aborta, reduciendo de ese modo su expresión y secreción de proteínas.

## SUMARIO

- 55 La presente invención proporciona una secuencia señal polipeptídica, que comprende un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip), en la que el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; o la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

La presente invención también proporciona una proteína de fusión que comprende esta secuencia señal polipeptídica operablemente enlazada a un polipéptido heterólogo.

5 El polipéptido heterólogo puede comprender una o más enzimas, uno o más modificadores de la respuesta biológica, una o más toxinas, uno o más anticuerpos, uno o más fragmentos del polipéptido heterólogo, o cualquier combinación de los mismos.

El polipéptido heterólogo puede comprender uno o más de los siguientes:  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida, proinsulina, hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2), interferón, anticuerpo terapéutico, y una hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1).

10 La presente invención también proporciona vector de expresión de proteínas, que comprende: (a) un promotor enlazado operablemente a una primera secuencia de ADN, en el que dicha primera secuencia de ADN codifica la secuencia señal polipeptídica, y (b) una segunda secuencia de ADN que está fusionada en el marco a dicha primera secuencia de ADN, en el que dicha segunda secuencia de ADN codifica un polipéptido heterólogo.

15 La segunda secuencia de ADN puede codificar  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida, proinsulina, hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2), interferón, anticuerpo terapéutico, o una hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

25 La Figura 1 muestra el efecto funcional de secuencia señal para la expresión y secreción de  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida humana de tipo salvaje recombinante a lo largo de un período de alrededor de 72 horas.

La Figura 2 muestra la expresión y secreción preferente de  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida humana de tipo salvaje recombinante a lo largo de un período de alrededor de 63 horas a una densidad celular elevada y sin nutrientes.

30 La Figura 3 muestra el efecto funcional de secuencias señal para la expresión y secreción de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana de tipo salvaje recombinante a lo largo de un período de alrededor de 43 horas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Como se usa aquí, un "polipéptido heterólogo" es cualquier polipéptido que no es un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip).

Como se usa aquí, "Bip" es una abreviatura para proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina.

35 Las secuencias señal polipeptídicas adecuadas comprenden un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip), que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23.

40 Las proteínas de fusión adecuadas comprenden un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) operablemente enlazado a un polipéptido heterólogo. El fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23. Todas estas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular. Los cultivos celulares también pueden ser en condiciones de cultivo celular no óptimas. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. El polipéptido heterólogo puede ser una o más enzimas, uno o más modificadores de la respuesta biológica, una o más toxinas, uno o más anticuerpos, uno o más fragmentos del polipéptido heterólogo, o cualquier combinación de los mismos. El polipéptido heterólogo puede ser  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida. El polipéptido heterólogo puede ser también  $\alpha$ -galactosidasa ácida. El polipéptido heterólogo puede ser también  $\alpha$ -glucosidasa ácida. El polipéptido heterólogo puede ser también proinsulina. El polipéptido heterólogo puede ser también la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2). El polipéptido heterólogo puede ser también interferón. El polipéptido heterólogo puede ser también un anticuerpo terapéutico. El polipéptido heterólogo puede ser también la hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1).

Otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de

- inmunoglobulina humana (Bip) pueden comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, y el polipéptido heterólogo puede comprender  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con  $\beta$ -glucocerebrosidasa de tipo salvaje ( $\beta$ -glucocerebrosidasa con la secuencia señal de  $\beta$ -glucocerebrosidasa nativa).
- 5 La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de  $\beta$ -glucocerebrosidasa a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de  $\beta$ -glucocerebrosidasa a lo largo de alrededor de un período de 3 días.
- 10 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender  $\alpha$ -galactosidasa. Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con  $\alpha$ -galactosidasa de tipo salvaje ( $\alpha$ -galactosidasa con la secuencia señal de  $\alpha$ -galactosidasa nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa a lo largo de alrededor de un período de 3 días.
- 15
- 20 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con  $\alpha$ -glucosidasa ácida de tipo salvaje ( $\alpha$ -glucosidasa ácida con la secuencia señal de  $\alpha$ -glucosidasa ácida nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida a lo largo de alrededor de un período de 3 días.
- 25
- 30 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender proinsulina. Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con proinsulina de tipo salvaje (proinsulina con la secuencia señal de proinsulina nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de proinsulina a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de proinsulina a lo largo de alrededor de un período de 3 días.
- 35
- 40 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2). Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2) de tipo salvaje (la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2) con la secuencia señal de la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2) nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2) a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de la hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2) a lo largo de alrededor de un período de 3 días.
- 45
- 50
- 55 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender interferón. Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con interferón de tipo salvaje (interferón con la secuencia señal de interferón nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de interferón a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de interferón a lo largo de alrededor de un período de 3 días.
- 60 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de

5 inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender un anticuerpo terapéutico. Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con un anticuerpo terapéutico de tipo salvaje (un anticuerpo terapéutico con la secuencia señal de un anticuerpo terapéutico nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de un anticuerpo terapéutico a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad del anticuerpo terapéutico a lo largo de alrededor de un período de 3 días.

10 En otras proteínas de fusión adecuadas con el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, el polipéptido heterólogo puede comprender hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1). Esas proteínas de fusión se pueden caracterizar por tener una mayor expresión en cultivo celular en comparación con hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1) de tipo salvaje (hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1) con la secuencia señal de hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1) nativa). La mayor expresión en cultivo celular se puede medir evaluando la actividad de hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1) a lo largo de un período de alrededor de 3 días. El cultivo celular también puede ser en condiciones no óptimas de cultivo celular. Las condiciones no óptimas de cultivo celular pueden ser densidad celular elevada y sin nutrientes. La mayor expresión en cultivo celular con densidad celular elevada y sin nutrientes se puede medir evaluando la actividad de hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1) a lo largo de alrededor de un período de 3 días.

25 Un vector de expresión proteica adecuado puede comprender un promotor enlazado operablemente a una primera secuencia de ADN que codifica una secuencia señal polipeptídica, que comprende un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, y una segunda secuencia de ADN que codifica un polipéptido heterólogo, que está fusionada en el marco a la primera secuencia de ADN. La segunda secuencia de ADN puede codificar  $\beta$ -glucocerebrosidasa.

30 Un vector de expresión proteica adecuado puede comprender un promotor enlazado operablemente a una primera secuencia de ADN que codifica una secuencia señal polipeptídica, que comprende un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, y una segunda secuencia de ADN que codifica un polipéptido heterólogo, que está fusionada en el marco a la primera secuencia de ADN. La segunda secuencia de ADN puede codificar  $\alpha$ -glucosidasa ácida.

35 Un vector de expresión proteica adecuado puede comprender un promotor enlazado operablemente a una primera secuencia de ADN que codifica una secuencia señal polipeptídica, que comprende un fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23, y una segunda secuencia de ADN que codifica un polipéptido heterólogo, que está fusionada en el marco a la primera secuencia de ADN. La segunda secuencia de ADN puede codificar  $\alpha$ -galactosidasa ácida. El polipéptido heterólogo también puede ser proinsulina. El polipéptido heterólogo también puede ser hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2) u hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1). El polipéptido heterólogo también puede ser interferón. El polipéptido heterólogo puede ser también un anticuerpo terapéutico. El polipéptido heterólogo también puede ser cualquier otra proteína que se segregue fuera de células.

45 Un método adecuado para producir un polipéptido puede comprender expresar una proteína de fusión con el fragmento modificado de la proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) enlazada operablemente a un polipéptido heterólogo, y recuperar dicho polipéptido heterólogo. El método para producir un polipéptido se puede llevar a cabo en células cultivadas. Las células cultivadas pueden ser células de levadura o células de mamífero. El método para producir un polipéptido se puede llevar a cabo en un sistema transgénico. Ese sistema transgénico puede comprender vacas, cabras, ovejas, conejos, o cualquier combinación de los mismos. La recuperación desde el sistema transgénico puede ser desde la leche. El sistema transgénico también puede comprender pollos. La recuperación desde el sistema transgénico puede ser a partir de huevos.

50 Un método adecuado para obtener un vector de expresión proteica puede comprender enlazar operablemente un promotor a una primera secuencia de ADN que codifica una secuencia señal polipeptídica que comprende un fragmento modificado de la proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip), y fusionar en el marco una segunda secuencia de ADN que codifica un polipéptido heterólogo a la primera secuencia de ADN. El método para obtener un vector de expresión proteica también puede tener una primera secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o SEQ ID NO: 23. El método para obtener un vector de expresión proteica también puede tener una segunda secuencia ADN que codifica  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida,  $\alpha$ -galactosidasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida, proinsulina, hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2), interferón, anticuerpo terapéutico, o una hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1), u otras proteínas que son segregadas fuera de células.

Un método adecuado para incrementar la expresión proteica puede comprender expresar una proteína de fusión que comprende un fragmento modificado de una proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) y una proteína heteróloga, y recuperar la proteína heteróloga.

- 5 Un método adecuado para incrementar la secreción proteica puede comprender expresar una proteína de fusión que comprende un fragmento modificado de la proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) y una proteína heteróloga, y recuperar la proteína heteróloga.

### EJEMPLO 1

#### Reactivos

- 10 El ADNc de  $\beta$ -glucocerebrosidasa ("GlcCerasa") humana de tipo salvaje (NM\_000157.3), el ADNc de  $\alpha$ -galactosidasa A ácida (GLA) humana de tipo salvaje (NM\_000169.2), el ADNc de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana de tipo salvaje (NM\_000152.2), y el ADNc del factor 2 de crecimiento similar a insulina (IGF-2) humano de tipo salvaje (NM\_000612.4) se adquirieron todos ellos de Origene™ (Rockville, MD), mientras que todos los cebadores oligonucleotídicos y minigenes sintéticos procedieron de Integrated DNA Technologies™ (IDT™; Coralville, IA). El vector de expresión de mamíferos pEF6/V5-HisA, el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (FBS), y otros reactivos de cultivo tisular se obtuvieron de Invitrogen™ (Carlsbad, CA).  
15 Las endonucleasas de restricción, Phusion-HF DNA polymerase™, T4 ADN ligasa, fosfatasa antártica, *E. coli* químicamente competente (células DH5 $\alpha$ ) se adquirieron todas ellas de New England Biolabs™ (Ipswich, MA). Los sustratos fluorogénicos para diversas glicosidasas se adquirieron de Research Products International™ (Mt. Prospect, IL), los kits de extracción en gel de ADN y de ADN Miniprep procedieron de QIAGEN™ (Valencia, CA), el kit PureYield Maxiprep DNA™ procedió de Promega™ (Madison, WI). Excepto que se señale de otro modo, todas las sustancias químicas procedieron de Sigma™ (St. Louis, MO), el reactivo de transfección Fugene-HD™ procedió de Roche™ (Indianápolis, IN), las células de riñón embrionario humano transformadas con el antígeno T (HEK293T) procedieron de ATCC™.

### EJEMPLO 2

- 25 Construcción del plásmido

Se construyeron plásmidos de ADN para codificar diversas proteínas modelo que contienen sus secuencias señal nativas o que se reemplazaron por secuencias señal de Bip humana modificadas, para evaluar el efecto de estas secuencias señal sobre la expresión y secreción de proteínas de ensayo.

- 30 Para evaluar  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida humana (GlcCerasa, EC 3.2.1.45), se construyeron varios plásmidos de ADN diferentes para codificar GlcCerasa de tipo salvaje con su secuencia señal nativa o con la secuencia señal de Bip humana, o una secuencia señal de Bip modificada. Para generar GlcCerasa humana de tipo salvaje con su secuencia señal nativa, el ADNc de GlcCerasa humano completo se amplificó mediante PCR vía Phusion-HF DNA polymerase™ usando Cebadores 1 y 2 (Tabla I) y un clon de ADNc de GlcCerasa (NM\_000157.3, Origene). El cebador 1 se construyó para contener un sitio de restricción 5' Bgl II y un sitio de restricción de EcoRI interno que precedió inmediatamente a la secuencia de Kozak de GlcCerasa nativa, mientras que el cebador 2 contenía los sitios de restricción 3' NheI y NotI, que sucedieron al codón de parada, para permitir la clonación del producto de la PCR en vectores de expresión de mamífero. El producto de la PCR de ~1,6 kilobases (kb) (A) se separó y se cortó a partir de gel preparativo de agarosa al 1% (p/v), y se aisló usando el kit de extracción en gel de QIAGEN™. El producto de la PCR A se digirió subsiguientemente toda la noche con las endonucleasas de restricción Bgl II y NotI a 37°C, se volvió a purificar y se ligó en el vector de expresión de mamífero pEF6/V5-HisA (Invitrogen™), que se había digerido previamente con BamHI y Not I y desfosforilado con fosfatasa antártica usando T4 ADN ligasa. El sitio de restricción Bgl II se incorporó en el cebador 1 de manera que la ligación del producto de la PCR de GlcCerasa digerido con Bgl II en el sitio de BamHI compatible del vector pEF6/V5-HisA eliminó el sitio de restricción de BamHI dentro del sitio de clonación múltiple, y este vector de expresión modificado se denominará aquí en lo sucesivo como pEF6'. Este constructo de ADN, denominado pHD101, se usó para transformar células de *E. coli* químicamente competentes, y las colonias bacterianas individuales resistentes a ampicilina se expandieron y se cribaron mediante reacciones de digestión con enzimas de restricción usando EcoRI y NheI y con BamHI, respectivamente. Un ADN plasmídico correcto procedente del clon 4 (denominado pHD101.4) se verificó adicionalmente mediante secuenciación de ADN, y se escogió para la expresión de GlcCerasa de tipo salvaje. pHD101.4 se usó para construir  
40 otros plásmidos que codifican GlcCerasa de tipo salvaje con la secuencia señal de Bip humana o versiones modificadas de esta secuencia señal de Bip en lugar de la secuencia señal de GlcCerasa nativa. De forma breve, se construyó un minigén de ADN bicatenario (denominado minigén 1 en la Tabla II) (y se sintetizó mediante Integrated DNA Technologies™, IDT™) para contener la secuencia de Kozak nativa procedente del gen de alcohol oxidasa 1 (AOX1) de levadura, el gen para toda la secuencia señal de Bip humana nativa de 18 restos (incluyendo su secuencia de reconocimiento de peptidasa señal natural: Ser-Ala-Ala-Arg-Ala; SAARA (SEQ ID NO:24)) y los restos de 123 aminoácidos N-terminales de GlcCerasa humana de tipo salvaje madura (nucleótidos 118-490). El minigén 1 también contenía un sitio de restricción de 5' EcoRI, que precedió a la secuencia de Kozak de AOX1, y un sitio de NcoI natural dentro del gen de GlcCerasa en el extremo 3', para permitir la clonación en pHD101.4 para sustituir la secuencia señal de GlcCerasa nativa por la secuencia señal de Bip humana. Además, esta estrategia permite la

construcción de plásmidos de ADN para la expresión de GlcCerasa de tipo salvaje (con la secuencia señal de Bip) en sistemas de mamíferos o de levaduras (que están bajo el control del promotor de AOX1 inducible). El diseño de esta y de otras proteínas de fusión utilizó el programa de análisis SignalP 4.0™ para predecir si la secuencia señal de Bip sería escindida de la proteína de ensayo.

5 Se añadieron restos de aminoácidos adicionales a los constructos según sea necesario para facilitar la escisión de las secuencias señal, y solamente las secuencias que se predice que tienen una escisión de la secuencia señal apropiada se escogieron para generar aquellas proteínas de ensayo de fusión. Para la expresión en sistemas de mamífero, el fragmento de ADN de Bip-GlcCerasa, que contiene la secuencia de Kozak de Bip humana nativa, se sintetizó vía PCR usando los Cebadores 3 y 4 y el molde de ADN del minigén 1. Este producto de la PCR de ~440  
10 pb (B) se separó y se cortó a partir de gel preparativo de agarosa al 1% (p/v), y se aisló usando el kit de extracción en gel de QIAGEN. El producto de la PCR B se digirió toda la noche con las endonucleasas de restricción EcoRI y Nco I, se volvió a purificar y se ligó con el fragmento de ADN NcoI→Not I a partir de pHD101.4 que codifica los restos de aminoácidos 124-497 de GlcCerasa de tipo salvaje madura (que carece de las secuencias señal de GlcCerasa nativa) y el fragmento de ADN del vector EcoRI→Not I pEF6' de ~5,8 kb como se describe previamente.  
15 Este constructo de ADN, denominado pHD201, se comprobó mediante digestión con enzimas de restricción usando EcoRI-Xba I, y un clon correcto (pHD201.2) se verificó mediante secuenciación de ADN y subsiguientemente se usó para evaluar los efectos de la secuencia señal de Bip humana sobre la expresión y secreción de GlcCerasa de tipo salvaje. De forma similar, se construyó una versión modificada de la secuencia señal de Bip (minigén 2) y se sintetizó mediante IDT™ para que contenga la secuencia de Kozak nativa del gen de levadura de AOX1, los  
20 primeros 13 restos de la secuencia señal de Bip humana nativa seguido de una repetición de restos de aminoácidos 4-13, la secuencia de reconocimiento de peptidasa señal de Bip nativa (restos 14-18) y los 123 restos N-terminales de GlcCerasa humana de tipo salvaje madura (nucleótidos 118-490). Esta modificación de la secuencia señal de Bip (denominada como secuencia señal de Bip modificada 1) expandió el dominio hidrófobo de manera que abarcó toda la membrana del RE y alargó la secuencia señal de 18 a 28 restos. Para la expresión en sistemas de mamífero, la  
25 secuencia señal de Bip modificada 1-ADN de GlcCerasa, que contiene el fragmento de la secuencia de Kozak de Bip humana nativa, se sintetizó vía PCR usando los Cebadores 3 y 4 y el molde de ADN de minigén 2. Este producto de la PCR de ~470 pb (C) se aisló a partir de gel preparativo de agarosa al 1% (p/v), se digirió con EcoRI y Nco I, se volvió a purificar y se ligó con el fragmento de ADN Nco I→Not I de pHD101.4 que codifica los restos de aminoácidos 124-497 de GlcCerasa de tipo salvaje madura (que carece de la secuencia señal de GlcCerasa nativa) y el fragmento de ADN del vector EcoRI→Not I pEF6' de ~5,8 kb, como antes. Este constructo de ADN, denominado  
30 pHD204, se comprobó mediante digestión con enzimas de restricción usando EcoRI y Xba I, y se confirmó un clon correcto (pHD204.1) mediante secuenciación de ADN, y se usó subsiguientemente para evaluar los efectos de esta secuencia señal de Bip modificada sobre la expresión y secreción de GlcCerasa de tipo salvaje.

Los cebadores usados aquí para obtener los constructos de ADN se resumen en la Tabla 1.

35

Tabla 1

Cebador	Hebra	Secuencia oligonucleotídica (5'→3')	SEQ ID NO:
1	(+)	<sup>a</sup> ggcaagatctgaattc <b>gggatg</b> gagtttcaagtcctccagag	SEQ ID NO: 1
2	(-)	<sup>b</sup> tcgagcggccgaagctagcttatcatctggcagccacaggtag	SEQ ID NO:2
3	(+)	<sup>c</sup> ccacgaattccaagatgaagctctccctggtggc	SEQ ID NO:3
4	(-)	ctggccatgggtacccggatgatgttatc	SEQ ID NO:4
5	(+)	ccacgaattcgacaatgcagctgaggaacc	SEQ ID NO:5
6	(-)	ctcgaagcggccgcttaagtaagctctttaatgacatctgcat	SEQ ID NO:6
7	(+)	<sup>d</sup> P-gcactggacaatggattgg	SEQ ID NO:7
8	(+)	ccacgaattcaaccatgggagtgaggc	SEQ ID NO:8
9	(-)	ctcgaagcggccgcttaacaccagctgacgagaaac	SEQ ID NO:9
10	(+)	P-gctgcactcctgggg	SEQ ID NO:10
11	(+)	P-gctcagcagggagccagc	SEQ ID NO:11
12	(+)	P-gcagtgcccacacagtg	SEQ ID NO:12

<sup>a</sup> El codón de partida ATG se muestra en el texto en negrita dentro de la secuencia de consenso de Kozak de GlcCerasa nativa (subrayada). Las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción se muestran

en cursiva.

<sup>b</sup> El codón de parada está en cursiva y en negrita.

<sup>c</sup> El codón de partida ATG se muestra en el texto en negrita dentro de la secuencia de consenso de Kozak de Bip humana nativa (subrayada). Las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de restricción se muestran en cursiva.

<sup>d</sup> Los cebadores fosforilados se designan con el símbolo 5' "P".

5 La secuencia señal de Bip modificada 1 se anexó subsiguientemente a otras proteínas para evaluar su efecto sobre su expresión y secreción. De forma breve, se construyó el minigén 3 (Tabla II) para que contenga los primeros 13 restos de la secuencia señal de Bip humana nativa seguido de una repetición de los restos de aminoácidos 4-13 y restos 14-17 de la secuencia de reconocimiento de peptidasa señal de Bip nativa. El minigén 3 contenía la secuencia de Kozak nativa procedente de Bip humana, así como los sitios de restricción de 5' EcoRI y 3' Stu I y Not I. Stu I se incorporó en el minigén 3 debido a que esta enzima de restricción produce un extremo romo en 3' tras AGG (codón para arginina, Arg; R), que sirve como la Arg natural en el resto 17 de la secuencia de escisión de peptidasa señal de Bip nativa. Por lo tanto, cualquier proteína se puede ligar a este fragmento de la secuencia señal de Bip modificada, con la condición de que se añada una alanina adicional a la secuencia proteica en el término N para completar la secuencia de reconocimiento de peptidasa señal SAARA (SEQ ID NO: 24).

10 En la Tabla 2 se resumen las secuencias nucleotídicas de ADN de minigenes para las secuencias señal de Bip y Bip modificada.

Tabla 2

\* Minigen 1 (Bip humana nativa-GlcCerasa) SEQ ID NO:13:

*Secuencia nucleotídica (hebra sentido, 5' → 3'):*

*acggaattcgaaacgatgaagctctccctggtggccgcgatgctgctgctgctcagcggcgccggccgcccggcccctgca  
tcctaaaaagcttcggctacagctcgggtggtgtgtgtgcaatgccacatactgtgactcctttgacccccgaccttctcctccct  
tggtaccttcagccgctatgagagtacacgcagtggtggcgacggatggagctgagtatggggccatccaggctaatacacacgg  
gcacaggcctgctactgacctgacgccagaacagaagtccagaagtgaagggtttggaggggccatgacagatgctgct  
gctctcaacatccttgcctgtcaccctgcccaaaattgctacttaaatgtacttctctgaaagaaggatcggatataacatca  
tccgggtaccatggcc*

Minigen 2 (secuencia señal de Bip modificada 1-GlcCerasa) SEQ ID NO:14:

*Secuencia nucleotídica (hebra sentido, 5' → 3'):*

*acggaattcgaaacgatgaagctctccctggtggccgcgatgctgctgctgctcagcctggtggccgcgatgctgctgctcagc  
cggcggcgccgcccggcccctgcatccctaaaaagcttcggctacagctcgggtggtgtgtgtgcaatgccacatactgtgact  
cctttgacccccgaccttctccttggctaccttcagccgctatgagagtacacgcagtggtggcgacggatggagctgagtat  
ggggccatccaggctaatacacacgggcacagggcctgctactgacctgacgccagaacagaagtccagaaagtgaagg  
atttggaggggccatgacagatgctgctgctcctcaacatccttgcctgtcaccctgcccaaaattgctacttaaatgtactt  
tctgaagaaggatcggatataacatcatccgggtaccatggcc*

Minigen 3 (secuencia señal de Bip modificada 1) SEQ ID NO:15:

*Secuencia nucleotídica (hebra sentido, 5' → 3'):*

*acggaattcgaagatgaagctctccctggtggccgcgatgctgctgctgctcagcctggtggccgcgatgctgctgctgctca  
gcgcggcgaggcctgcggccgc*

Minigen 4 (secuencia señal de Bip modificada 2) SEQ ID NO:16:

*Secuencia nucleotídica (hebra sentido, 5' → 3'):*

*ggtaccgaattcgctggcaagatgaagctctccctggtggccgcgatgctgctgctgctgctgctgggtggcactgctgctcagc  
gcggcgaggcctctaga*

Minigen 5 (secuencia señal de Bip modificada 3) SEQ ID NO 17:

*Secuencia nucleotídica (hebra sentido, 5' → 3'):*

*ggtaccgaattcgctggcaagatg***aaagctctccctggtggccgcgatgctgctgctctccctggtggccctgctgctgctca**  
*gcgcggcgaggccttctaga*

Minegen 6 (secuencia señal de Bip modificada 4) SEQ ID NO 18:

*Secuencia nucleotídica (hebra sentido, 5' → 3'):*

*ggtaccgaattcgctggcaagatg***aaagctctccctggtggccgcgatgctgctgctgctgcactggtggccctgctgctgctc**  
*agcgcggcgaggccttctaga*

---

\* El codón de partida ATG se muestra en texto en negrita, mientras que la secuencia de consenso de Kozak está subrayada. Las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción se muestran en cursiva.

---

Para evaluar  $\alpha$ -galactosidasa ácida A (GLA, EC 3.2.1.22), la enzima de tipo salvaje con su secuencia señal nativa se amplificó mediante PCR usando los Cebadores 5 y 6 con el ADN molde del clon de ADNc de GLA (NM\_000169.2, Origene™). Este producto de la PCR de ~1,3 kb se aisló mediante gel preparativo de agarosa, se digirió con EcoRI y Not I, y se ligó al pEF6' desfosforilado, digerido con EcoRI-Not I. Este constructo de ADN se denominó pHD214, y se usó para evaluar la expresión de GLA. Para construir GLA con la secuencia señal de Bip modificada 1, la enzima GLA madura se sintetizó mediante PCR usando los Cebadores 6 y 7 con el ADN molde del clon de ADNc de GLA. Este producto de la PCR de ~1,2 kb (D) se digirió con Not I, se aisló a partir de gel preparativo de agarosa, y se ligó al fragmento de ADN del minigén 3 EcoRI→Stu I y al vector pEF6' digerido con EcoRI→Not I, como antes. Este constructo de ADN se denominó pHD215, y se usó para evaluar los efectos de esta secuencia señal de Bip modificada sobre la expresión y secreción de GLA de tipo salvaje.

Para evaluar  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA, EC 3.2.1.0), toda la enzima GAA de tipo salvaje (con su secuencia señal nativa) se amplificó mediante PCR usando los Cebadores 8 y 9 con el ADN molde del clon de ADNc de GAA (NM\_000152.2, Origene). Este producto de la PCR de ~3 kb (E) se aisló mediante gel preparativo de agarosa, se digirió con EcoRI y Not I, y se ligó al pEF6' desfosforilado, digerido con EcoRI-Not I. Este constructo de ADN se denominó pHD217, y se usó para evaluar la expresión de GAA con su secuencia señal nativa. Puesto que GAA es expresada con múltiples proyecciones que preceden a la enzima madura (Moreland et al., 2005), se sintetizaron proteínas de GAA diferentes con longitudes variables y se anexaron a la secuencia señal de Bip modificada 1 para el ensayo. Un fragmento de ADN de GAA, que carece de su secuencia señal nativa pero que contiene los restos 24-952, se sintetizó mediante PCR usando los Cebadores 9 y 10. Este producto de la PCR de ~3 kb (F) se aisló a partir de gel preparativo de agarosa, y se digirió con Not I y se ligó al fragmento de ADN del minigén 3 EcoRI→Stu I y al vector pEF6' digerido con EcoRI→Not I. Este constructo de ADN, que contiene la secuencia señal de Bip modificada 1 y GAA (24-952), se denominó pHD218. De forma similar, un fragmento de ADN de GAA, que carece de su secuencia señal nativa pero que contiene los restos 57-952, se sintetizó mediante PCR usando los Cebadores 9 y 11. Este producto de la PCR de ~2,9 kb (G) se aisló a partir de gel preparativo de agarosa, y se digirió con Not I y se ligó al fragmento de ADN del minigén 3 EcoRI→Stu I y al vector pEF6' digerido con EcoRI→Not I, como antes. Este constructo de ADN, que contiene la secuencia señal de Bip modificada 1 y GAA (57-952), se denominó como pHD219. Un fragmento de ADN de GAA, que carece de su secuencia señal nativa pero que contiene los restos 78-952, se sintetizó mediante PCR usando los Cebadores 9 y 12. Este producto de la PCR de ~2,8 kb (H) se aisló a partir de gel preparativo de agarosa, y se digirió con Not I y se ligó al fragmento de ADN del minigén 3 EcoRI→Stu I y al vector pEF6' digerido con EcoRI→Not I. Este constructo de ADN, que contiene la secuencia señal de Bip modificada 1 y GAA (78-952), se denominó como pHD220. Los efectos de esta secuencia señal de Bip modificada 1, así como de las proyecciones sobre la expresión y secreción de GAA, se pueden por lo tanto examinar cuidadosamente usando los constructos de ADN pHD217-220.

Se diseñaron otras secuencias señal de Bip modificadas (Tabla III), derivadas de la secuencia señal de Bip modificada 1, y se evaluarán para estudiar si estas modificaciones adicionales pueden mejorar adicionalmente la expresión y secreción proteicas. Estas modificaciones incluyen sustituir los restos de serina y de leucina en las posiciones 14 y 15 por un único resto de triptófano, y suprimir los restos de alanina y metionina en las posiciones 18 y 19 dentro del dominio hidrófobo (denominado secuencia señal de Bip modificada 2), suprimir los restos de alanina y metionina en las posiciones 18 y 19 dentro del dominio hidrófobo (denominado secuencia señal de Bip modificada 3), y sustituir un resto de serina en la posición 14 por alanina y suprimir los restos de alanina y metionina en las posiciones 18 y 19 dentro del dominio hidrófobo (secuencia señal de Bip modificada 4). Estas modificaciones estaban destinadas a incrementar la hidrofobia del dominio hidrófobo, que puede potenciar adicionalmente interacciones de estas secuencias señal con proteínas ribosómicas y translocadores del RE claves, y crear un sitio de escisión de peptidasas señal más eficiente para mejorar la translocación y secreción proteicas para proteínas recombinantes.

Otras proteínas de ensayo, incluyendo insulina humana, factor 2 de crecimiento similar a insulina (IGF-2), anticuerpos, interferones, apolipoproteínas, etc., también se evaluarán para determinar si estas secuencias señal de Bip modificadas mejorarían su expresión y secreción.

En la Tabla 3 se resumen las secuencias de aminoácidos para las secuencias señal de Bip modificadas.

Tabla 3

Secuencia señal ("s")	Secuencia de aminoácidos primaria	SEQ ID NO:
Native human Bip ss	<sup>d</sup> MKLSLVAAML LLL <u>SAARA</u>	SEQ ID NO:19
Mod. Bip ss-1	<sup>e</sup> MKLSLVAAML LLL <b>SLVAAM</b> LLLL <u>SAARA</u>	SEQ ID NO:20
Mod. Bip ss-2	MKLSLVAAML LLL <b>WV</b> ALLLL <u>SAARA</u>	SEQ ID NO:21
Mod. Bip ss-3	MKLSLVAAMLLLL <b>SLV</b> ALLLL <u>SAARA</u>	SEQ ID NO:22
Mod. Bip ss-4	MKLSLVAAML LLL <b>ALV</b> ALLLL <u>SAARA</u>	SEQ ID NO:23
<p><sup>d</sup> La secuencia de escisión de peptidasas señal de Bip nativa (SAARA) (SEQ ID NO: 24) se muestra en texto subrayado.</p> <p><sup>e</sup> Las modificaciones específicas para la secuencia señal de Bip se muestran en texto negrita para cada secuencia señal de Bip modificada.</p>		

### EJEMPLO 3

#### 5 Expresión transitoria de proteínas de ensayo

Para los experimentos de expresión transitoria, células HEK293T se colocaron en placas de cultivo tisular de 12 pocillos con 1 ml de medio DMEM suplementado con 10% de FBS, y se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando las células HEK293T alcanzaron el 70-100% de confluencia, el medio gastado se sustituyó por 1 ml de medio DMEM/10% de FBS reciente, y cada pocillo se transfectó con 1 µg de ADN plasmídico para proteínas de ensayo individuales o PBS (para un control negativo transfectado de forma simulada) y 3 µl del reactivo de transfección Fugene™-HD, según el protocolo del fabricante. Las células transfectadas se incubaron durante 24-72 horas y se comprobaron diariamente para la expresión de la enzima recombinante individual (segregada en el medio) vía ensayos de actividad enzimática y/o mediante transferencia Western y ELISA.

### EJEMPLO 4

#### 15 Ensayos de actividad enzimática

La expresión y secreción en el medio de cultivo de β-glucocerebrosidasa ácida humana recombinante (GlcCerasa) se evaluó mediante ensayos de actividad enzimática usando medio acondicionado procedente de experimentos de transfección transitoria tras 24, 48 o a alrededor de 72 h, y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-β-D-glucopiranosido (4-MU-β-Glc). De forma breve, se recogieron 20 µl de medios acondicionados procedentes de cada muestra en los puntos de tiempo indicados, y se diluyeron con 80 µl de amortiguador McIlvane (amortiguador MI: 50 mM de citrato de sodio/fosfato de sodio (pH 5,2)/0,25% (v/v) de Triton X-100/0,25% (p/v) de taurocolato de sodio) en tubos de minicentrífugadora de 0,5 ml. Veinticinco µl de cada muestra diluida se distribuyó en alícuotas en pocillos individuales de placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (realizado por triplicado), y se añadieron a cada pocillo 50 µl de sustrato de 4-MU-β-Glc 6 mM (preparado en amortiguador MI) vía un pipeteador de múltiples canales. Las placas se cerraron entonces herméticamente con cinta de recubrimiento, y se incubaron a 37°C durante 1 h. Las reacciones enzimáticas se detuvieron añadiendo 125 µl de NaOH 0,1 M, y la fluorescencia de 4-MU liberada se leyó en un lector de placas de fluorescencia usando longitudes de onda de 355 nm de excitación y 460 nm de emisión, respectivamente. La fluorescencia de 4-MU de la muestra transfectada de forma simulada sirvió como el control "de fondo", y se restó de todas las muestras de GlcCerasa.

La expresión y secreción de α-glucosidasa ácida humana recombinante (GAA) se midieron mediante ensayos de actividad enzimática usando medio acondicionado procedente de experimentos de transfección transitoria tras 24, 48 o 72 h y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-α-D-glucopiranosido (4-MU-α-Glc). Específicamente, se cosecharon 20 µl de medio acondicionado de cada muestra en los diferentes puntos de tiempo, y se diluyeron con 80 µl de amortiguador de acetato sódico 50 mM (pH 4,0) en tubos de microcentrifugadora de 0,5 ml. Se distribuyeron en forma de alícuotas veinticinco µl de cada muestra diluida en pocillos individuales de placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (por triplicado), y se añadieron a cada pocillo vía un pipeteador de múltiples canales 50 µl de sustrato 4-MU-α-Glc 6 mM (preparado en amortiguador de acetato sódico 50 mM, pH 4,0). Las placas se cerraron entonces herméticamente con una cinta de recubrimiento, y se incubaron a 37°C durante 1 h. Las reacciones enzimáticas se detuvieron añadiendo 125 µl de NaOH 0,1 M, y la fluorescencia de 4-MU liberada se leyó en un lector de placas de fluorescencia usando longitudes de onda de 355 nm de excitación y 460 nm de emisión, respectivamente. La fluorescencia de 4-MU de la muestra transfectada de forma simulada sirvió como el control de

“fondo”, y se restó de todas las muestras de GAA.

La expresión y secreción de  $\alpha$ -galactosidasa ácida humana recombinante (GLA) se midieron mediante ensayos de actividad enzimática usando medio acondicionado procedente de experimentos de transfección transitoria tras 24, 48 o 72 h y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (4-MU- $\alpha$ -Glc). Específicamente, se cosecharon 20  $\mu$ l de medio acondicionado de cada muestra en los diferentes puntos de tiempo, y se diluyeron con 80  $\mu$ l de amortiguador de citrato de sodio/fosfato de sodio 50 mM (pH 4,6) en tubos de microcentrifugadora de 0,5 ml. Se distribuyeron en forma de alícuotas veinticinco  $\mu$ l de cada muestra diluida en pocillos individuales de placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (por triplicado), y se añadieron a cada pocillo vía un pipeteador de múltiples canales 50  $\mu$ l de sustrato 4-MU- $\alpha$ -Glc 8 mM (preparado en amortiguador de citrato de sodio/fosfato de sodio 50 mM, pH 4,6). Las placas se cerraron entonces herméticamente con una cinta de recubrimiento, y se incubaron a 37°C durante 1 h. Las reacciones enzimáticas se detuvieron añadiendo 125  $\mu$ l de NaOH 0,1 M, y la fluorescencia de 4-MU liberada se leyó en un lector de placas de fluorescencia usando longitudes de onda de 355 nm de excitación y 460 nm de emisión, respectivamente. La fluorescencia de 4-MU de la muestra transfectada de forma simulada sirvió como el control de “fondo”, y se restó de todas las muestras de GLA.

## 15 EJEMPLO 5

Está reconocido que ciertas proteínas son expresadas de forma natural en niveles muy elevados, mientras que otras apenas son expresadas. Aunque la abundancia y estabilidad del ARNm son factores importantes al nivel transcripcional que pueden afectar a la expresión proteica, cada vez está más claro que las secuencias señal también desempeñan papeles críticos a nivel proteico, y contribuyen a esta expresión proteica dispar. La proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) tiene características específicas que serían particularmente ventajosas para desarrollar secuencias señal superiores para mejorar la expresión y secreción proteicas para proteínas recombinantes. Una vez que se obtuvo una secuencia señal de Bip modificada, se anexó a una proteína modelo para determinar si esta secuencia señal no natural mejoraría la expresión y secreción proteicas para la proteína modelo. Específicamente, el núcleo hidrófobo se alargó para formar una estructura de hélice  $\alpha$  más larga. Se predice que este alargamiento del dominio hidrófobo en la secuencia señal de Bip modificada 1 tendría varias ventajas. En primer lugar, el primer dominio hidrófobo modificado (el más largo) formaría una hélice  $\alpha$  más larga y abarcaría todo el túnel de salida ribosómico que se puede identificar por la proteína ribosómica Rpl17 para facilitar mejores interacciones con otras proteínas claves del RE, tales como las subunidades Sec61, y RAMP4. En segundo lugar, un dominio hidrófobo helicoidal  $\alpha$  más largo puede permitir que esta secuencia señal de Bip modificada interaccione con proteínas translocón clave, tales como las subunidades TRAM y Sec61, para ayudar a orientar eficientemente al polipéptido naciente en el poro del translocón para promover la orientación necesaria del bucle competente para la translocación proteica. En tercer lugar, un dominio hidrófobo helicoidal  $\alpha$  más largo puede permitir que esta secuencia señal de Bip modificada se mueva fuera del poro del translocón acuoso y hacia el interior de la bicapa lipídica de forma más eficiente, de manera que se puede escindir mediante peptidasa señal a una velocidad más rápida. En cuarto lugar, una secuencia señal de Bip modificada se puede alejar del translocón a una velocidad más rápida para permitir que la proteína recombinante interaccione con otras proteínas importantes, tales como oligosacaryltransferasa, proteínas chaperonas del RE tales como Bip, proteína disulfuro isomerasa y calnexina, de forma más pronto durante su síntesis para mejorar el plegamiento de la proteína. Todos y cada uno de estos beneficios potenciales mejoraría la velocidad de expresión proteica, el plegamiento y la exportación fuera de las células.

Se pueden hacer otras modificaciones, incluyendo añadir restos cargados a regiones de flaqueo del dominio hidrófobo extendido para potenciar adicionalmente su hidrofobia y ayudar a orientar apropiadamente la secuencia señal en el translocón. Estas modificaciones están destinadas a potenciar las interacciones de las secuencias señal con ciertas proteínas ribosómicas, particularmente Rpl17, que a su vez incrementarían las interacciones con proteínas translocón Sec61 $\beta$ , RAMP4 y TRAM para mejorar la translocación de proteínas, la expresión y secreción de proteínas.

Se generaron varios constructos de ADN diferentes, que codifican GlcCerasa de tipo salvaje, para que contengan la secuencia señal de GlcCerasa nativa (*WT GlcCerasa*) o la secuencia señal de Bip humana (*CBP201 GlcCerasa*), o la secuencia señal de Bip modificada 1 (*CBP204 GlcCerasa*) nueva. Estos constructos (1  $\mu$ g) se ensayaron mediante experimentos de expresión transitoria en la estirpe celular humana (HEK293T), que estaba en una confluencia del ~80%. El medio de cultivo celular acondicionado (20  $\mu$ l) se cosechó diariamente durante el transcurso de tiempo de 72 h y se evaluó para determinar la actividad enzimática de GlcCerasa usando el sustrato fluorogénico 4-MU- $\beta$ -glucosa para evaluar los efectos de las secuencias señal sobre la expresión y secreción de GlcCerasa. Como se puede observar en la Figura 1, ambas secuencias señal pueden promover la expresión y secreción de GlcCerasa en el medio de cultivo celular. Sin embargo, se observó que la secuencia señal de Bip modificada 1 manipulada (en *CBP204 GlcCerasa*) produce una actividad de GlcCerasa 2 veces superior con respecto a *WT GlcCerasa* 72 h tras la transfección. Se observó actividad basal para el control negativo transfectado de forma simulado (vector vacío), y se confirmó que el incremento de actividad enzimática resultó de la expresión de GlcCerasa recombinante. Los múltiples experimentos de transfección (n >3) confirmaron que la nueva secuencia señal incrementó la expresión y secreción de GlcCerasa.

**EJEMPLO 6**

La síntesis proteica se ve muy afectada por la disponibilidad de nutrientes (es decir, ATP, aminoácidos, hidratos de carbono, etc.) así como otros componentes celulares esenciales (por ejemplo, factores de iniciación y de alargamiento, ARNt, chaperonas proteicas, etc.). Los primeros se pueden incrementar o reponer con medio de cultivo celular durante el reabastecimiento, mientras que los últimos componentes están limitados en las células y no se pueden suplementar durante la producción de proteínas. El agotamiento de estos componentes vitales provoca un estrés celular significativo, lo que da como resultado la reducción o incluso suspensión de nueva síntesis proteica para la mayoría de las proteínas. De forma interesante, la expresión de algunas proteínas se mantiene y de hecho aumentó durante estos períodos estresantes como parte de una respuesta celular adaptativa para ayudar a las células a volver a la homeostasis. No está completamente claro cómo estas proteínas selectas son distinguidas por la maquinaria de síntesis proteica celular para permitir su expresión preferente, pero se cree que las secuencias señal desempeñan un papel importante en este proceso. Puesto que Bip es una proteína chaperona del RE importante cuya expresión se mantiene durante este período estresante para ayudar a restablecer la homeostasis celular, predecimos que esta secuencia señal de Bip modificada permitiría la expresión preferente de la proteína recombinante heteróloga para que se mantenga en condiciones en las que la expresión de otras proteínas se reduce o se suprime. Para probar esta hipótesis, transfectamos cultivos de células KEK293T a una densidad celular elevada (~100% confluyente) con *WT GlcCerasa* y *CBP204 GlcCerasa*, y se monitorizó la expresión y secreción a lo largo de un período de 63 h. Además, el medio de cultivo celular no se cambió durante el experimento para agotar nutrientes (durante las últimas etapas del experimento para imitar períodos de pocos nutrientes durante aplicaciones por lotes antes del reabastecimiento), para determinar si la expresión de *WT GlcCerasa* y *CBP204 GlcCerasa* cambia en respuesta al agotamiento de los nutrientes.

Nuestros resultados muestran que, en estas condiciones experimentales, *CBP204 GlcCerasa*, que contiene la secuencia señal de Bip modificada 1, se expresó mejor que *WT GlcCerasa* con su secuencia señal nativa a lo largo del período de 63 h, como se muestra en la Figura 2. Los niveles de *CBP204 GlcCerasa* fueron 1,9 veces mayores que *WT GlcCerasa* tras 24 h, 2,1 veces mayores tras 48 h, y 2,5 veces mayores tras 63 h. Cuando se extrapola a 72 h, *CBP204 GlcCerasa* sería 3,3 veces mayor que *WT GlcCerasa*. De forma importante, la expresión de *CBP204 GlcCerasa* se mantuvo a una velocidad casi constante en la que hubo una duplicación de la proteína segregada después de cada día. Por el contrario, la velocidad de expresión para *WT GlcCerasa* se ralentizó significativamente en los puntos de tiempo más tardíos. Esta diferencia fue muy evidente cuando se compara la forma de las curvas de expresión para estas dos enzimas – una curva casi lineal para *CBP204 GlcCerasa* y una curva no lineal para *WT GlcCerasa* a medida que la velocidad de expresión se estabilizó en los puntos de tiempo más tardíos. Estos datos muestran la expresión diferencial de *CBP204 GlcCerasa* y *WT GlcCerasa*, presumiblemente en respuesta al agotamiento de nutrientes, y esta divergencia se incrementaría aún más con incubaciones más largas. Puesto que la única diferencia entre *CBP204 GlcCerasa* y *WT GlcCerasa* es la secuencia señal, estos datos apoyan la hipótesis de que la secuencia señal de Bip modificada 1 permitió la expresión preferente durante condiciones de cultivo celular no óptimas.

**EJEMPLO 7**

Para estudiar los efectos de la secuencia señal de Bip modificada 1 sobre la expresión y secreción de una proteína modelo diferente, se construyeron plásmidos de ADN para codificar  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana de tipo salvaje (GAA) que contiene su secuencia señal de GAA nativa (*WT GAA*) o la secuencia señal de Bip 1 manipulada y los restos de aminoácidos 24-952 de GAA (denominado como *CBP218 GAA*). Estos constructos de ADN se estudiaron mediante expresión transitoria en HEK293T a lo largo de un período de ~2 días para comparar directamente los efectos de estas secuencias señal sobre la expresión y secreción de GAA de tipo salvaje. Como se puede observar en la Figura 3, *CBP218 GAA* tuvo una actividad de GAA segregada 2,5 veces mayor en medio que *WT GAA* 43 h tras la transfección. Se observó actividad basal para el control negativo transfectados de forma simulada (vector vacío), y se confirmó que la actividad enzimática observada en el medio resultó de la expresión de GAA recombinante. Estos resultados muestran que la secuencia señal de Bip modificada 1 (en *CBP218 GAA*) incrementó significativamente la expresión y secreción de GAA en las mismas condiciones experimentales, puesto que la única diferencia entre *CBP218 GAA* y *WT GAA* es sus secuencias señal respectivas.

**EJEMPLO 8**

Ensayos de transferencia Western y de ELISA

La expresión y secreción de proteínas de ensayo se evaluarán mediante análisis de transferencia Western. De forma breve, se recogerá medio de cultivo celular acondicionado procedente de experimentos de transfección transitoria tras 24, 48 o 72 h, y se someterá a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transferirá subsiguientemente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueará con 4% (p/v) de leche desnatada en disolución salina amortiguada con TRIS/0,1% (v/v) de Tween-20 (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. La membrana se incubará entonces con el anticuerpo primario (por ejemplo, anti-IGF-2 humano de conejo) que se había diluido apropiadamente (por ejemplo, 1:5000) en 4% (p/v) de leche desnatada en TBST durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C con agitación. La mancha se lavará entonces con TBST a temperatura ambiente con agitación y múltiples cambios de amortiguador a lo largo de

1 h. La mancha se incubará entonces con un anticuerpo secundario enlazado a enzima (por ejemplo, anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante) que se había diluido apropiadamente (por ejemplo, 1:20.000) en 4% (p/v) de leche desnatada en TBST durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. La mancha se lavará entonces con TBST a temperatura ambiente con agitación y múltiples cambios de amortiguador a lo largo de 1 h. La mancha se incubará entonces con sustrato quimioluminiscente durante 5 min. a temperatura ambiente, y se visualizará mediante un sistema de formación de imágenes o mediante película, para evaluar el nivel de expresión de la proteína de ensayo.

De forma similar, la expresión de las proteínas de ensayo se puede evaluar mediante ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISA). De forma breve, placas inmunosorbentes de 96 pocillos se revestirán con 50 µl de anticuerpos primarios (por ejemplo, anti-IGF-2 humano de conejo) a una concentración de proteína de 5 µg/ml en disolución salina amortiguada con TRIS (TBS). Estas placas se bloquearán entonces con 200 µl de 4% (p/v) de leche desnatada en TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Se recogerá medio de cultivo celular acondicionado procedente de experimentos de transfección transitoria tras 24, 48 o 72 h, y se incubará en estas placas durante 1 h a temperatura ambiente. Estas placas se lavarán entonces con 200 µl de TBST a temperatura ambiente con agitación y múltiples cambios de amortiguador durante 1 h. Estas placas se incubarán entonces con un anticuerpo secundario enlazado a enzima (por ejemplo, anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante) que se había diluido apropiadamente (por ejemplo, 1:20.000) en TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Estas placas se lavarán entonces con TBST con múltiples cambios de amortiguador a lo largo de 1 h a temperatura ambiente. Estas placas se incubarán entonces con un sustrato colorimétrico (por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, TMB) durante 5-15 min. a temperatura ambiente, y se detendrán con ácido sulfúrico 0,1 M, y se leerán en un lector de placas a una longitud de onda apropiada (por ejemplo, 450 nm) para evaluar la expresión de la proteína de ensayo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DO, Hung

25 <120> Nuevas secuencias señal para mejorar las expresiones de proteínas y la secreción de enzimas recombinantes y de otras proteínas

<130> CALL-0014

<150> US 61/415,926

<151> 2010-11-22

30 <160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 1

ggcaagatct gaattcgga tggagtttc aagtcctcc agag 44

40 <210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador sintético

<400> 2

tcgagcggcc gcaagctagc ttatcactgg cgacgccaca ggtag 45  
 <210> 3  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 3  
 ccacgaattc caagatgaag ctctccctgg tggc 34  
 10 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador sintético  
 <400> 4  
 ctggccatgg gtacccggat gatgttatat c 31  
 <210> 5  
 <211> 30  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 5  
 25 ccacgaattc gacaatgcag ctgaggaacc 30  
 <210> 6  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 6  
 ctcgaagcgg ccgcttaaag taagtctttt aatgacatct gcat 44  
 <210> 7  
 35 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sintético  
 <220>  
 <221> característica diversa  
 5 <223> Cebador fosforilado  
 <400> 7  
 gactggaca atggattg 19  
 <210> 8  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 8  
 15 ccacgaattc aaccatggga gtgaggc 27  
 <210> 9  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 9  
 ctggaagcgg ccgcctaaca ccagctgacg agaaac 36  
 <210> 10  
 25 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 30 <220>  
 <221> característica diversa  
 <223> Cebador fosforilado  
 <400> 10  
 gctgcactcc tgggg 15  
 35 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN

ES 2 687 415 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <220>

5 <221> característica diversa  
 <223> Cebador fosforilado  
 <400> 11  
 gctcagcagg gagccagc 18  
 <210> 12

10 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético

15 <220>  
 <221> característica diversa  
 <223> Cebador fosforilado  
 <400> 12  
 gcagtgcca cacagtg 17

20 <210> 13  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>

25 <221> característica diversa  
 <223> Minigen 1 (Bip humana nativa-GlcCerasa)  
 <400> 13  
 acggaattcg aaacgatgaa gctctccctg gtggccgcga tgctgctgct gctcagcgcg 60  
 gcgcggggccg cccgccctg catccctaaa agcttcggct acagctcggg ggtgtgtgtc 120  
 tgcaatgcca catactgtga ctctttgac cccccgacct ttctgccct tggtagcttc 180  
 agccgctatg agagtacacg cagtgggcga cggatggagc tgagtatggg gccatccag 240  
 gctaatacaca cgggcacagc cctgctactg accctgcagc cagaacagaa gttccagaaa 300  
 gtgaagggat ttggaggggc catgacagat gctgctgctc tcaacatcct tgccctgtca 360  
 cccctgccc aaaatttgct acttaaatcg tacttctctg aagaaggaat cggatataac 420  
 atcatccggg taccatggc c 441

<210> 14

ES 2 687 415 T3

<211> 471  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Minigen 2 (secuencia señal de Bip modificada 1-GlcCerasa)  
 <400> 14  
 acggaattcg aaacgatgaa gctctccctg gtggccgcga tgctgctgct gctcagcctg 60  
 gtggccgcga tgctgctgct gctcagcgcg gcgcggggccg cccgccctg catccctaaa 120  
 agcttcggct acagctcggg ggtgtgtgtc tgcaatgccca catactgtga ctcctttgac 180  
 cccccgacct ttctgacct tggtagcttc agccgctatg agagtacacg cagtgggcca 240  
 cggatggagc tgagtatggg gcccatccag gctaatacaca cgggcacagg cctgctactg 300  
 accctgcagc cagaacagaa gttccagaaa gtgaagggat ttggaggggc catgacagat 360  
 gctgctgctc tcaacatcct tgccctgtca cccctgccc aaaatttgc acttaaactg 420  
 tacttctctg aagaaggaat cggatataac atcatccggg taccatggc c 471  
 <210> 15  
 <211> 106  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Minigen 3 (secuencia señal de Bip modificada 1)  
 <400> 15  
 acggaattcg caagatgaag ctctccctgg tggccgcgat gctgctgctg ctcagcctgg 60  
 15 tggccgcgat gctgctgctg ctcagcgcgg cgaggcctgc ggccgc 106  
 <210> 16  
 <211> 102  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Minigen 4 (secuencia señal de Bip modificada 2)  
 <400> 16  
 ggtaccgaat tgctggcaa gatgaagctc tcctgggtgg ccgcatgct gctgctgctc 60  
 tgggtggcac tgctgctgct cagcgcggcg aggccttcta ga 102  
 <210> 17  
 25 <211> 105  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 687 415 T3

```

<220>
<223> Minigen 5 (secuencia señal de Bip modificada 3)
<400> 17
  ggtaccgaat tcgctggcaa gatgaagctc tccttgggtgg ccgcatgatgct gctgctgctc      60
  tccttgggtgg ccctgctgct gctcagcgcg gcgaggcctt ctaga                          105
5  <210> 18
  <211> 105
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
  <220>
10 <223> Minigen 6 (secuencia señal de Bip modificada 4)
  <400> 18
  ggtaccgaat tcgctggcaa gatgaagctc tccttgggtgg ccgcatgatgct gctgctgctc      60
  gcactgggtgg ccctgctgct gctcagcgcg gcgaggcctt ctaga                          105
  <210> 19
  <211> 18
15 <212> PRT
  <213> Homo sapiens
  <220>
  <221> característica diversa
  <223> Secuencia señal de Bip humana nativa
20 <400> 19
  Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala
  1          5          10          15

  Arg Ala
  <210> 20
  <211> 28
  <212> PRT
25 <213> Secuencia artificial
  <220>
  <223> ss-1 de Bip modificada
  <400> 20
  Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val
  1          5          10          15

  Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala
  20          25
30 <210> 21

```

ES 2 687 415 T3

<211> 25  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> ss-2 de Bip modificada  
<400> 21  
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ala  
1 5 10 15  
  
Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala  
20 25  
<210> 22  
<211> 26  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> ss-3 de Bip modificada  
<400> 22  
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val  
1 5 10 15  
  
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala  
15 20 25  
<210> 23  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> ss-4 de Bip modificada  
<400> 23  
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val  
1 5 10 15  
  
Ala Leu Leu Leu Leu Arg Ser Ala Ala Arg Ala  
25 20 25  
<210> 24  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
30 <220>  
<221> característica diversa

# ES 2 687 415 T3

<223> Secuencia de reconocimiento de peptidasa señal para Bip nativa humana

<400> 24

Ser Ala Ala Arg Ala  
1 5

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una secuencia señal polipeptídica, que comprende un fragmento modificado de una proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip), en la que el fragmento modificado de proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina humana (Bip) consiste en la secuencia de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.
2. Una proteína de fusión que comprende una secuencia señal polipeptídica según la reivindicación 1, operablemente enlazada a un polipéptido heterólogo.
- 10 3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en la que el polipéptido heterólogo comprende una o más enzimas, uno o más modificadores de la respuesta biológica, una o más toxinas, uno o más anticuerpos, uno o más fragmentos del polipéptido heterólogo, o cualquier combinación de los mismos.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en la que el polipéptido heterólogo comprende uno o más de los siguientes:  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida, proinsulina, hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2), interferón, anticuerpo terapéutico, y una hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1).
- 15 5. Un vector de expresión proteica, que comprende: (a) un promotor enlazado operablemente a una primera secuencia de ADN, en el que dicha primera secuencia de ADN codifica una secuencia señal polipeptídica según la reivindicación 1, y (b) una segunda secuencia de ADN que está fusionada en el marco a dicha primera secuencia de ADN, en el que dicha segunda secuencia de ADN codifica un polipéptido heterólogo.
- 20 6. El vector de expresión proteica de la reivindicación 5, en el que la segunda secuencia de ADN codifica  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida,  $\alpha$ -glucosidasa ácida, proinsulina, hormona 2 del crecimiento similar a insulina (IGF-2), interferón, anticuerpo terapéutico, o una hormona 1 del crecimiento similar a insulina (IGF-1).

# Expresión Diferencial y Secreción de $\beta$ -Glucocerebrosidasa Ácida

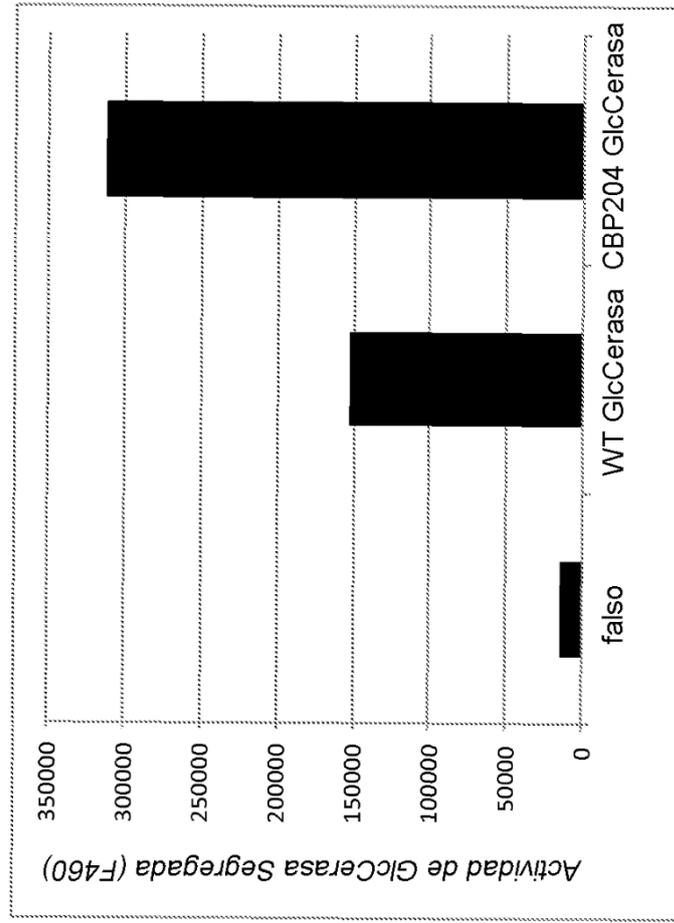


Figura 1

# Expresión Diferencial de Beta-Glucocerebrosidasa Ácida Durante el Agotamiento de Nutrientes en Cultivos Celulares de Alta Densidad

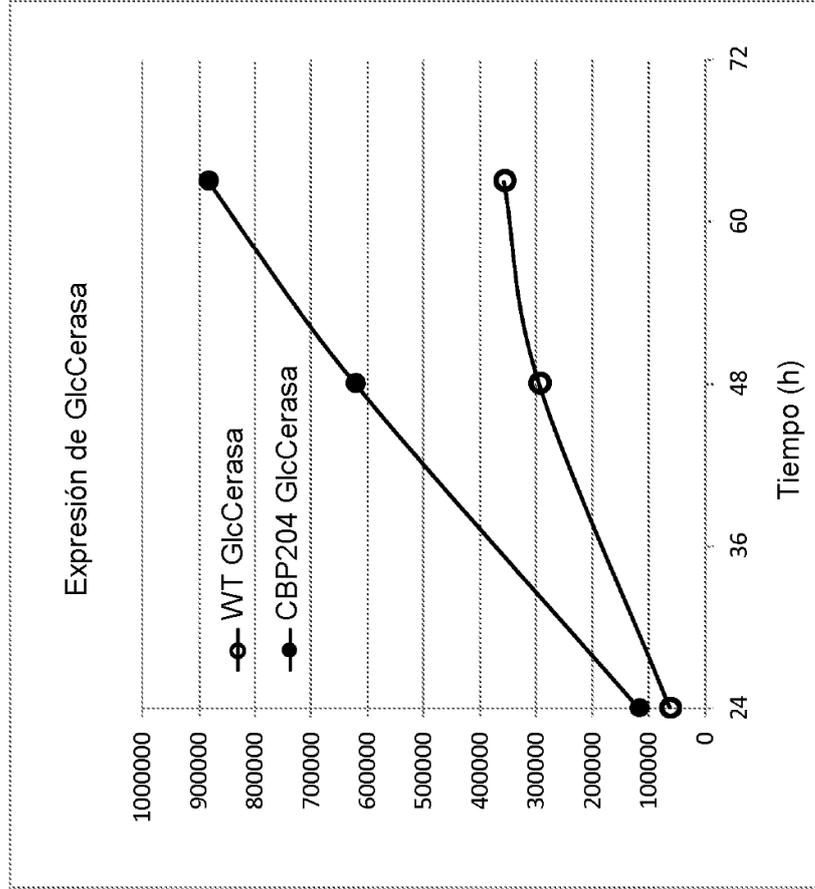


Figura 2

# Expresión Diferencial y Secreción de $\alpha$ -Glucosidasa Ácida

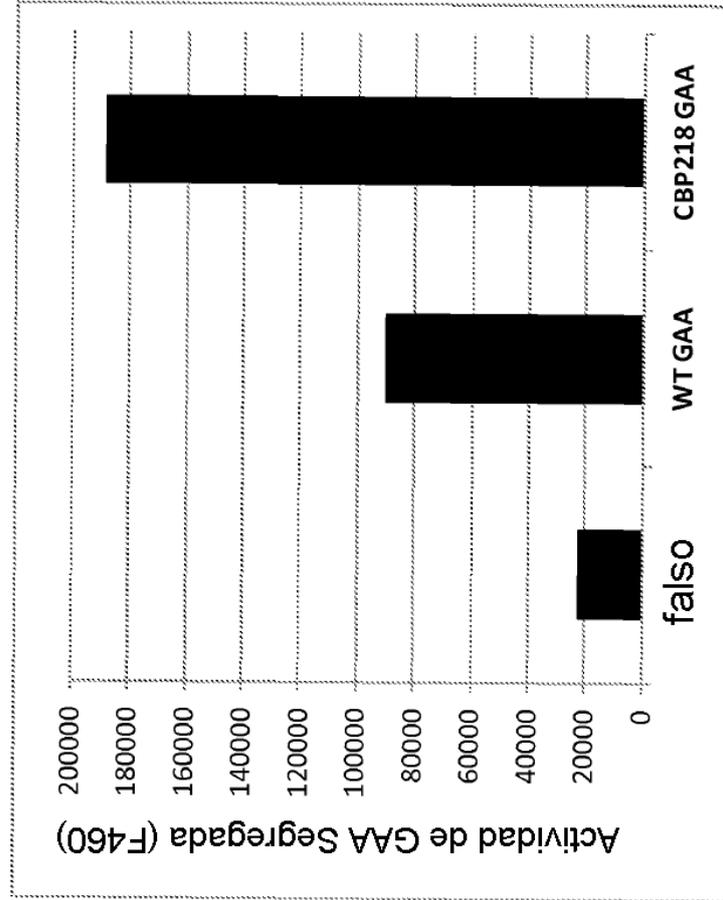


Figura 3