

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 843**

51 Int. Cl.:

C12N 9/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011 E 16173953 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3088514**

54 Título: **Alfa-galactosidasa estabilizada y usos de la misma**

30 Prioridad:

02.03.2010 US 309487 P
17.11.2010 WO PCT/IL2010/000956
20.01.2011 US 201161434503 P
20.01.2011 US 201161434499 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2019

73 Titular/es:

PROTALIX LTD. (100.0%)
2 Snunit Street Science Park
2010000 Carmiel, IL

72 Inventor/es:

SHULMAN, AVIDOR;
RUDERFER, ILYA;
BEN-MOSHE, TEHILA;
SHEKHTER, TALIA;
AZULAY, YANIV;
SHAALTIEL, YOSEPH y
KIZHNER, TALI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 708 843 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

Alfa-galactosidasa estabilizada y usos de la misma

5 Campo y Antecedentes de la Invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a nuevas estructuras de proteína multimérica y, más particularmente, aunque no exclusivamente, a estructuras de proteína multiméricas de α -galactosidasa y a usos de las mismas en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

10 La enzima lisosómica α -galactosidasa-A (α -GAL o α -Gal A; EC 3.2.1.22) cataliza la retirada de galactosa de los oligosacáridos, glucoproteínas y glucolípidos durante el catabolismo de macromoléculas. Los déficits en enzimas lisosómicas conducen a la acumulación de sus sustratos en los tejidos, afecciones conocidas como enfermedades de almacenamiento lisosómico. En los seres humanos, la ausencia de α -galactosidasa-A funcional conduce a la
15 acumulación de glucolípidos que contienen restos de α -galactosa terminales (principalmente globotriaosilceramida, que también recibe el nombre de "trihexósido ceramida", "CTH" o "Gb₃") en los tejidos, lo que conduce a la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X, descrito por primera vez en 1898, caracterizado por dolor crónico, opacidades oculares, disfunción hepática y renal, lesiones en la piel, deterioro vascular y/o insuficiencia cardíaca. La α -galactosidasa-A humana recombinante tiene la capacidad de restaurar la función enzimática en pacientes, y la terapia de reemplazo enzimático (ERT, del inglés) usando α -GAL se aprobó en los Estados Unidos en el año 2003 como un tratamiento para la enfermedad de Fabry. α -GAL se convirtió en la segunda proteína recombinante aprobada para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico después de la β -glucosidasa, un tratamiento para la enfermedad de Gaucher.

25 Las α -GAL endógena y recombinante catalizan la hidrólisis de glucolípidos galactosilados terminales en los lisosomas de células de órganos tales como el hígado, riñones, bazo, corazón, etc. Este sitio natural de acción se caracteriza por su bajo pH, que llega a ser tan bajo como de 4,5. Las enzimas lisosómicas, incluyendo α -GAL, están por tanto diseñadas para ejercer su actividad máxima a estos niveles de pH bajos.

30 Los tratamientos actuales de la enfermedad de Fabry con ERT se basan en la α -GAL recombinante procedente de células de mamífero que se considera un tratamiento eficaz limitado. Estos tratamientos únicamente desaceleran el avance de la enfermedad, pero no pueden detenerlo y no ofrecen una solución verdadera y completa. Adicionalmente, en algunos casos, debe interrumpirse la ERT con α -GAL recombinantes comerciales debido al desarrollo de una respuesta inmunogénica al tratamiento y, en algunos casos, el tratamiento no puede iniciarse en
35 vista de los problemas de inmunogenicidad.

El análisis de la estructura de rayos X revela que la α -GAL humana es una glucoproteína homodimérica estando cada monómero compuesto de dos dominios, el dominio a (β/α)₈ que contiene el sitio activo y el dominio C-terminal que contiene ocho cadenas β antiparalelas en dos láminas en un sándwich β [Garman & Garboczi, J Mol Biol 2004, 337:319-335]. Los dos monómeros están dispuestos en un ensamblaje cabeza a cola y la dimerización es no covalente. Los dos monómeros se empaquetan con una interfaz que extiende la anchura de 75 Å del dímero y oculta 2.200 Å² de área superficial. En la interfaz del dímero, 30 restos de cada monómero contribuyen a la interfaz. Los dos sitios activos del dímero están separados por aproximadamente 50 Å.

45 Se resolvió la estructura cristalina de α -Gal para una proteína no ligada, así como para una proteína ligada a galactosa. Estas dos estructuras exhiben pocos cambios entre las estructuras ligada y no ligada. No obstante, el uso de galactosa en lugar del sustrato natural, la globotriaosilceramida (Gb₃), estando esta última caracterizada por cadenas lipídicas largas capaces de interactuar con el dominio hidrófobo de un monómero mientras que la galactosa terminal interacciona con el sitio activo del segundo monómero, puede no demostrar la cooperatividad de sitio activo. Adicionalmente, las pruebas bioquímicas sugieren dicha cooperatividad, ilustrando la importancia de la estructura cuaternaria homodimérica [Bishop & Desnick, J Biol Chem 1981, 256:1307-1316]. Por lo tanto, se estudiaron las propiedades cinéticas de la α -Gal humana y se observó la cooperatividad entre los monómeros de la enzima homodimérica, cada uno con un sitio de interacción catalítico. Por lo tanto, se sugirió que la actividad y estabilidad enzimática podían depender de la dimerización.

55 El documento WO 2009/024977, del cesionario del presente documento, enseña conjugados de un sacárido y una biomolécula, unidos entre sí de manera covalente mediante un enlazador no hidrófobo, así como usos médicos que utilizan dichos conjugados.

60 La Solicitud de Patente Internacional PCT N.º PCT/IL2010/000956, del cesionario del presente documento, enseña metodologías que utilizan α -galactosidasa, que exhibe una actividad lisosómica a niveles de pH mayores que el pH lisosómico.

65 Adicionalmente, la técnica anterior incluye Bendele *et al.* [Toxicological Sciences 1998, 42:152-157], las Patentes de Estados Unidos N.º 5.256804, 5.580757 y 5.766.897, la Solicitud de Patente Internacional PCT/NL2007/050684 (publicada como WO 2008/075957) y Seely & Richey [J Chromatography A 2001.908: 235-241].

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una estructura de proteína multimérica que comprende al menos dos monómeros de α -galactosidasa que están ligados de manera covalente entre sí mediante un radical de unión, presentando la estructura de proteína multimérica una característica seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una actividad α -galactosidasa, después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones de plasma humano durante una hora, que es al menos un 10 % superior que una actividad de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a condiciones de plasma humano durante una hora;

(b) una actividad α -galactosidasa que disminuye después de someter la estructura de la proteína multimérica a condiciones de plasma humano durante una hora, en un porcentaje que es al menos un 10 % menor que el porcentaje que disminuye la actividad de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a condiciones de plasma humano durante una hora;

(c) una actividad α -galactosidasa que permanece sustancialmente sin cambios después de someter a la estructura de proteína multimérica a condiciones de plasma humano durante una hora.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una estructura de proteína multimérica que comprende al menos dos monómeros de α -galactosidasa que están ligados de manera covalentemente entre sí mediante un radical de unión, en la que el radical de unión no está presente en la α -galactosidasa nativa.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una estructura de proteína multimérica como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de la enfermedad de Fabry, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una estructura de proteína multimérica como se describe en el presente documento, tratando de esta manera la enfermedad de Fabry.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un proceso para la preparación de una estructura de proteína multimérica como se describe en el presente documento, comprendiendo el proceso hacer reaccionar la α -galactosidasa con un agente de reticulación que comprende el radical de unión descrito en el presente documento y al menos dos grupos reactivos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el radical de unión descrito en el presente documento no está presente en la α -galactosidasa nativa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la estructura de la proteína multimérica presenta una característica del grupo que consiste en:

(a) una actividad α -galactosidasa, después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones de plasma humano durante una hora, que es al menos un 10 % superior que una actividad de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a condiciones de plasma humano durante una hora;

(b) una actividad α -galactosidasa que disminuye después de someter la estructura de la proteína multimérica a condiciones de plasma humano durante una hora en un porcentaje que es al menos un 10 % menor que el porcentaje que disminuye la actividad de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a condiciones de plasma humano durante una hora;

(c) una actividad α -galactosidasa que permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones de plasma humano durante una hora.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la actividad α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica que permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones lisosómicas durante un día, adicionalmente permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones lisosómicas durante una semana.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la semivida en circulación de la estructura de proteína multimérica que es mayor que una semivida en circulación de la α -galactosidasa nativa, es mayor en al menos un 20 % que la semivida en circulación de la α -galactosidasa nativa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la semivida en circulación de la estructura de proteína multimérica que es mayor que una semivida en circulación de la α -galactosidasa nativa, es mayor en al menos un 50 % que la semivida en circulación de la α -galactosidasa nativa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por una actividad α -galactosidasa en un órgano después de la administración de la estructura de proteína multimérica a un vertebrado, seleccionándose el órgano del grupo que consiste en bazo, corazón y riñón.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la estructura de proteína multimérica comprende dos monómeros de α -galactosidasa, siendo la estructura de proteína una estructura de proteína dimérica.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la α -galactosidasa es una α -galactosidasa humana.

10 De acuerdo algunas realizaciones de la invención, la α -galactosidasa es una α -galactosidasa recombinante de planta.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la α -galactosidasa tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la α -galactosidasa es una α -galactosidasa alcalina.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la α -galactosidasa es una α -galactosidasa ácida.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el radical de unión comprende un poli(alquilenglicol).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el poli(alquilenglicol) comprende al menos dos grupos funcionales, formando cada grupo funcional un enlace covalente con uno de los monómeros de α -galactosidasa.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los al menos dos grupos funcionales son grupos terminales del poli(alquilenglicol).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el al menos un radical de unión tiene una fórmula general:

30
$$-X_1-(CR_1R_2-CR_3R_4-Y)_n-X_2-$$

en la que cada uno de X_1 y X_2 es un grupo funcional que forma un enlace covalente con al menos un monómero de α -galactosidasa;

Y es O, S o NR_5 ;

35 n es un número entero de 1 a 200; y

cada uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, alcoxi, hidroxi, oxo, tiol y tioalcoxi.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, al menos uno de los grupos funcionales forma un enlace amida con un monómero de α -galactosidasa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, n es un número entero de 5 a 150.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, n es un número entero de 40 a 70.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende adicionalmente una galactosa.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la estructura de proteína multimérica es para su uso como un medicamento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la estructura de proteína multimérica es para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el proceso comprende hacer reaccionar la α -galactosidasa dimérica con el agente de reticulación.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los grupos reactivos comprenden un grupo saliente.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo reactivo reacciona con un grupo amina para formar un enlace amida.

65

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, cada uno de los grupos reactivos puede formar un enlace covalente entre el radical de unión y al menos un monómero de α -galactosidasa

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proporción molar entre el agente de reticulación y los monómeros de α -galactosidasa se encuentra en un intervalo de 5:1 a 500:1.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proporción molar se encuentra en un intervalo de 75:1 a 300:1.

10 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por un experto habitual en la materia a la cual pertenece la invención. Aunque en la práctica o ensayo de las realizaciones de la invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no deben considerarse necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

20 La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán por la oficina tras solicitarlas y pagar la tasa necesaria.

25 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo referencia específica ahora a los dibujos con detalle, cabe destacar que las particularidades mostradas se ofrecen como ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada junto con los dibujos pone de manifiesto a los expertos en la materia cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

30 La FIG. 1 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Fabrazyme®, α -GAL Replagal® y α -GAL-I humana recombinante vegetal, en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C);

35 La FIG. 2 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Fabrazyme®, α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal y α -GAL-I recombinante vegetal con galactosa (100 mg/ml), en función del tiempo de incubación en condiciones fisiológicas simuladas (pH 7,4, 37 °C);

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Fabrazyme®, α -GAL Replagal® y α -GAL-I humana recombinante vegetal, en función del tiempo de incubación en plasma humano a 37 °C;

40 La FIG. 4 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Fabrazyme®, α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal y α -GAL-I recombinante vegetal con galactosa (100 mg/ml), en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C);

La FIG. 5 es un esquema que representa las estructuras moleculares de agentes de reticulación de bis-N-hidroxisuccinimida-poli(etilenglicol) (bis-NHS-PEG) ejemplares;

La FIG. 6 es un esquema que representa una proteína dimérica que ha reaccionado con agentes de reticulación de bis-NHS-PEG;

45 La FIG. 7 presenta un barrido de un gel de SDS-PAGE que muestra α -GAL-I recombinante vegetal que ha reaccionado con bis-NHS-PEG₅ (carriles 1-3), bis-NHS-PEG₈ (carriles 7-9) y bis-NHS-PEG₄₅ (carriles 4-6), a una relación molar de 50:1 (carriles 1, 4 y 7), 100:1 (carriles 2, 5 y 8) y 200:1 (carriles 3, 6 y 9) de bis-NHS-PEG: α -GAL, así como marcadores de peso molecular (Pm) y patrón de α -GAL-I (Estd) recombinante vegetal que no ha reaccionado (las flechas muestran la banda que comprende un dímero de α -GAL).

50 La FIG. 8 presenta un barrido de un gel de isoelectroenfoco que muestra un α -GAL-I recombinante vegetal que ha reaccionado con bis-NHS-PEG₅ (carriles 1-3), bis-NHS-PEG₈ (carriles 7-9) y bis-NHS-PEG₄₅ (carriles 4-6), a una proporción molar de 50:1 (carriles 1, 4 y 7), 100:1 (carriles 2, 5 y 8) y 200:1 (carriles 3, 6 y 9) de bis-NHS-PEG: α -GAL, así como marcadores (M) de pH y patrón de α -GAL-I (Estd) recombinante vegetal que no ha reaccionado (las flechas muestran valores de pH para varias bandas);

55 La FIG. 9 es un espectro de espectroscopia de masas MALDI-TOF de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada por bis-NHS-PEG₄₅ (el eje x indica valores m/z, y se muestran los valores m/z de los picos);

La FIG. 10 es un espectro de espectroscopia de masas MALDI-TOF de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada por bis-NHS-PEG₈ (el eje x indica valores m/z, y se muestran los valores m/z de picos);

60 La FIG. 11 presenta una fotografía que muestra el sustrato α -GAL trihexósido de N-dodecanoil-nitrobenzoxadiazol-ceramida (Gb₃-NBH) y el producto de reacción de α -GAL lactosil ceramida-nitrobenzoxadiazol (lactosil ceramida-NBH), y visualizado con radiación con luz UV (365 nm), después de cromatografía de capa fina de alto rendimiento, seguido de incubación del sustrato Gb₃-NBD con α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (carril izquierdo), α -GAL Replagal® (carril central) y sin α -GAL (carril derecho);

65 Las FIG. 12A, 12B y 12C, son gráficos que muestran la actividad de α -GAL Fabrazyme®, α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₅ (FIG. 12A), bis-NHS-PEG₈ (FIG. 12B) y bis-NHS-PEG₄₅ (FIG. 12C) a una relación molar de 50:1 ("I" en FIG.

12A, "7" en FIG. 12B y "4" en FIG. 12C), 100:1 ("2" en FIG. 12A, "8" en FIG. 12B y "5" en FIG. 12C) y 200:1 ("3" en FIG. 12, "9" en FIG. 12B y "6" en FIG. 12C) de bis-NHS-PEG: α -GAL en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37°C);

La FIG. 13 es un gráfico que muestra el perfil farmacocinético de α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ en el plasma de ratones con la enfermedad de Fabry; la actividad residual de cada α -GAL se presenta como un porcentaje de la actividad residual máxima de cada α -GAL, en función del tiempo que después de la inyección de las α -GAL.

Las FIG. 14A y 14B presentan un gráfico (FIG. 14A) que muestra la actividad de α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ (prh-alfa-GAL-I-CL8) o bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-I-CL45) en los bazos de ratones con la enfermedad de Fabry dos horas después de la inyección de α -GAL, y una fotografía de una transferencia de Western (FIG. 14B) que muestra α -GAL Replagal® (carriles 10-12 y 15), α -GAL-I humana recombinante vegetal (carriles 7-9 y 13), y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ (carriles 4-6) o bis-NHS-PEG₄₅ (carriles 1-3 y 14) en los bazos de ratones con la enfermedad de Fabry después de inyección de α -GAL (carriles 1-12) o como un patrón que consiste en 50 ng de α -GAL (carriles 13-15);

Las FIG. 15A y 15B presentan un gráfico (FIG. 15A) que muestra la actividad de α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ (prh-alfa-GAL-I-CL8) o bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-I-CL45) en los hígados de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección de α -GAL, y una fotografía de una transferencia de Western (FIG. 15B) que muestra α -GAL Replagal® (carriles 10-12 y 15), α -GAL-I humana recombinante vegetal (carriles 7-9 y 13) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ (carriles 4-6) o bis-NHS-PEG₄₅ (carriles 1-3 y 14) en los hígados de ratones con la enfermedad de Fabry después de inyección de α -GAL (carriles 1-12) o como un patrón que consiste en 50 ng de α -GAL (carriles 13-15);

La FIG. 16 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ (Prh-alfa-GAL-I-) o bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-I-CL45) en los corazones de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección de α -GAL;

La FIG. 17 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ (Prh-alfa-GAL-I-CL8) o bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-I-CL45) en los riñones de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección de α -GAL;

La FIG. 18 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal® y α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (Prh-alfa-GAL-I-CL45) en los bazos de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas, 24 horas, 3 días y 7 días después de la inyección de α -GAL (como patrón, se muestra α -GAL de tipo silvestre (WT) endógena);

La FIG. 19 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal® y α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I), y α -GAL I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (Prh-alfa-GAL-I-CL45) en los hígados de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas, 24 horas, 3 días y 7 días después de inyección de α -GAL (como patrón, se muestra α -GAL de tipo silvestre (WT) endógena);

La FIG. 20 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal® y α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I), y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (Prh-alfa-GAL-I-CL45) en los corazones de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas, 24 horas, 3 días y 7 días después de la inyección de α -GAL (como patrón, se muestra α -GAL de tipo silvestre (WT) endógena);

La FIG. 21 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal® y α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-I), y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (Prh-alfa-GAL-I-CL45) en los riñones de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas, 24 horas, 3 días y 7 días después de la inyección de α -GAL (como patrón, se muestra α -GAL de tipo silvestre (WT) endógena);

La FIG. 22 presenta una fotografía de una imagen de un gel de SDS-PAGE que muestra la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (carril izquierdo), y la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® que se hizo reaccionar con bis-NHS-PEG₄₅ (carril central), así como marcadores de peso molecular (carril derecho; los pesos moleculares de los marcadores se indican en unidades kDa);

La FIG. 23 presenta una fotografía de un gel de isoelectroenfoque que muestra α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (carril izquierdo), y α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® que reaccionó con bis-NHS-PEG₄₅ (carril central), así como marcadores de pH (carril derecho);

Las FIG. 24A y 24B son espectros de espectroscopia de masas MALDI-TOF de la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (FIG. 24A), y α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (el eje x indica valores m/z, y se muestran los valores m/z (en unidades Da) de los picos);

La FIG. 25 es una representación gráfica de Michaelis-Menten que muestra la velocidad (V) de la hidrólisis de *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (*p*NP-G) por la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (Replagal) y la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (Replagal CL45), en función de la concentración de *p*NP-G;

Las FIG. 26A y 26B son gráficos que muestran la actividad de la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (Replagal) y la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® reticulada por bis-NHS-PEG₄₅ (Replagal-CL45) en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C) (FIG. 26A) o en plasma humano a 37 °C (FIG. 26B);

Las FIG. 27A-27D son gráficos que muestran la actividad de α -GAL Replagal® (R) y α -GAL Replagal® reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (R-CL45) en los bazos (FIG. 27A), hígados (Fig. 27B), corazones (FIG. 27C) y riñones (FIG. 27D) de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección de α -GAL;

Las FIG. 28A-28D son gráficos que muestran los niveles de Gb₃ en los corazones (FIG. 28A), riñones (FIG. 28B), hígados (FIG. 28C) y bazos (FIG. 28D) de ratones con la enfermedad de Fabry, en función del tiempo después de la inyección de α -GAL Replagal® o α -GAL Replagal® reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (R-CL45);

Las FIG. 29A y 29B presentan barridos de geles de SDS-PAGE que muestran la α -GAL-II humana recombinante vegetal (FIGS. 29A y 29B, carril 2) y la α -GAL-II humana recombinante vegetal que reaccionó con bis-NHS-PEG₂₁ (FIG. 29A, carril 3), bis-NHS-PEG₄₅ (FIG. 29A, carril 4) o bis-NHS-PEG₆₈ (FIG. 29B, carril 3), así como marcadores de peso molecular (FIG. 29A y 29B, carril 1; los pesos moleculares de los marcadores se indican en unidades KDa);

Las FIG. 30A-30C son espectros de espectroscopia de masas MALDI-TOF de α -GAL-II humana recombinante vegetal (FIG. 30A), y α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₂₁ (FIG. 30B) o bis-NHS-PEG₄₅ (FIG. 30C) (el eje x indica valores de m/z y se muestran los valores de m/z (en unidades Da) de los picos);

Las FIG. 31A-31D son gráficos que muestran la actividad de α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (Replagal), α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-II) y α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada por bis-NHS-PEG₂₁ (prh-alfa-GAL-II-CL21, FIG. 31A y 31C), bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-II-CL45, FIG. 31A-31D) o bis-NHS-PEG₆₈ (prh-alfa-GAL-II-CL68; FIG. 31B y 31D) en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C) (FIG. 31A y 31B) o en plasma humano a 37 °C (FIG. 31C y 31D) (los datos mostrados en las FIG. 31C y 31D son de experimentos diferentes);

Las FIG. 32A y 32B son gráficos que muestran los perfiles farmacocinéticos de α -GAL Replagal® (Replagal), α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-II) y α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-II-CL45) en el plasma de ratones con la enfermedad de Fabry; la concentración de cada α -GAL se presenta en función del tiempo después de la inyección de α -GAL (las FIG. 32A y 32B presentan los mismos datos a diferentes intervalos);

Las FIG. 33A-33L son gráficos que muestran la actividad de α -GAL Replagal® (Replagal), α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-II) y α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-II-CL45, FIG. 33A-33L) o bis-NHS-PEG₂₁ (prh-alfa-GAL-II-CL21; FIG. 33E-33L) en los corazones (FIG. 33A, 33E y 33I), riñones (FIG. 33B, 33F y 33J), hígados (FIG. 33C, 33G y 33K) y bazos (FIG. 33D, 33H y 33L) de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas (FIG. 33A-33H), 7 días (FIG. 33A-33D y 33I-33L), 14 días (FIG. 33A-33D) y 28 días (FIG. 33A-33D) después de inyección de α -GAL;

Las FIG. 34A-34C son gráficos que muestran los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ (FIG. 34A), K_M (FIG. 34B) y k_{cat} (FIG. 34C) para la α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL-II) y la α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (prh-alfa-GAL-II-CL45) en función del pH;

La FIG. 35 presenta un barrido de un gel de SDS-PAGE que muestra la α -GAL-1 humana recombinante vegetal (prh- α -Gal-I) y la α -GAL-I humana recombinante vegetal que ha reaccionado con NHS-PEG protegido terminalmente con metoxi que tiene un peso molecular de 2 KDa (prh- α -Gal-I-PEG 2.000), 5 KDa (prh- α -Gal-I-PEG 5.000) o 10 KDa (prh- α -Gal-I-PEG 10.000), así como marcadores de peso molecular (carril izquierdo; los marcadores de peso molecular se indican en unidades KDa);

Las FIG. 36A y 36B son gráficos que muestran la actividad de α -GAL humana recombinante de mamífero Fabrazyme® (Fabrazyme), α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® (Replagal), α -GAL-I humana recombinante vegetal y α -GAL-I humana recombinante vegetal que ha reaccionado con NHS-PEG protegido terminalmente con epoxi que tiene un peso molecular de 2 KDa (α -Gal-I-PEG 2.000), 5 KDa (α -Gal-I-PEG 5.000) o 10 KDa (α -Gal-I-PEG 10.000), en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C) (FIG. 36A) o en plasma humano a 37 °C (FIG. 36B);

La FIG. 37 presenta un barrido de un gel de SDS-PAGE que muestra α -GAL-I recombinante vegetal que ha reaccionado con bis-NHS-PEG₂ (carriles 1-3), bis-NHS-PEG₄ (carriles 4-6), bis-NHS-PEG₆₈ (carriles 7-9), bis-NHS-PEG₁₅₀ (carriles 10-12) y bis-NHS-PEG₄₅ (CL45), a una proporción molar de 50:1 (carriles 1, 4, 7 y 10), 100:1 (carriles 2, 5, 8 y 11) y 200:1 (carriles 3, 6, 9 y 12) de bis-NHS-PEG:a-GAL, así como marcadores de peso molecular (PM);

La FIG. 38 presenta un barrido de un gel de SDS-PAGE que muestra α -GAL-I recombinante vegetal que ha reaccionado con bis-COOH-PEG₁₂ (carriles 1-3), bis-COOH-PEG₂₈ (carriles 4-6), bis-COOH-PEG₄₅ (carriles 7-9) y bis-NHS-PEG₄₅ (CL45), a una proporción molar de 50:1 (carriles 1, 4 y 7), 100:1 (carriles 2, 5 y 8) y 200:1 (carriles 3, 6 y 9) de bis-NHS-PEG:a-GAL, así como marcadores de peso molecular (PM) y α -GAL-I recombinante vegetal no reticulada como control (con);

La FIG. 39 es un gráfico que muestra la actividad de α -GAL Replagal®, α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-I) y α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CLA45), bis-NHS-PEG₄ (prh- α -GAL-I-CL4), bis-NHS-PEG₂ (prh- α -GAL-I-CL2), bis-COOH-PEG₄₅ (prh- α -GAL-I-CLA45), bis-COOH-PEG₂₈ (prh- α -GAL-I-CLA28) o bis-COOH-PEG₁₂ (prh- α -GAL-I-CLA12) en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C);

Las FIG. 40A y 40B son gráficos que muestran la actividad de la α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada por bis-NHS-PEG₄₅ en función del tiempo de incubación en condiciones lisosómicas simuladas (tampón fosfato citrato, pH 4,6, 37 °C) (FIG. 40A) o en plasma humano a 37 °C (FIG. 40B). (La FIG. 40B muestra

la actividad de la α -GAL recombinante de mamífero Replagal® y α -GAL-II humana recombinante vegetal no reticulada para comparación);

La FIG. 41 presenta un barrido de un gel de SDS-PAGE que muestra α -GAL-II recombinante vegetal de 3 lotes diferentes (carriles 1-3) y α -GAL-II recombinante vegetal que ha reaccionado con bis-NHS-PEG₄₅ de 5 lotes diferentes (carriles 4-8), así como marcadores de peso molecular (PM);

La FIG. 42 presenta un barrido de un gel de isoelectroenfoque que muestra la α -GAL-II recombinante vegetal de 3 lotes diferentes (carriles 1-3) y α -GAL-II recombinante vegetal que ha reaccionado con bis-NHS-PEG₄₅ de 5 lotes diferentes (carriles 4-8), así como marcadores de pH (M);

Las FIG. 43A-43F son espectros de espectroscopia de masas MALDI-TOF de α -GAL-II humana recombinante vegetal (FIG. 43A) y α -GAL-II humana vegetal reticulada por bis-NHS-PEG₄₅ de 5 lotes diferentes (FIG. 43B-43F, respectivamente) (el eje x indica valores de m/z, y se muestran los valores de m/z (en unidades Da) de los picos); y

La FIG. 44 es un gráfico que muestra la velocidad catalítica (V) de la actividad α -GAL exhibida por la α -GAL-II humana vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ de 5 lotes diferentes, en función de la concentración del sustrato (*p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido).

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a nuevas estructuras de proteína multimérica y, más particularmente, aunque no exclusivamente, a estructuras de proteína multimérica de α -galactosidasa y a sus usos en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, debe entenderse que la invención no se limita necesariamente en su solicitud a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o llevarse a la práctica o realizarse de distintas maneras.

Los déficits de una proteína lisosómica (por ejemplo, defectos en una proteína lisosómica o ausencia de una proteína lisosómica) pueden causar un daño considerable a la salud de un sujeto (una enfermedad de almacenamiento lisosómico). La terapia de reemplazo enzimático (ERT), en la que se administra a un paciente la proteína deficiente, se ha usado en intentos de tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico. Sin embargo, la administración de la proteína deficiente no da como resultado necesariamente un aumento considerable y/o persistente en la actividad de la proteína *in vivo*.

La enfermedad de Fabry es un ejemplo de una enfermedad de almacenamiento lisosómico (heredada) recesiva ligada al cromosoma X que puede causar una amplia gama de síntomas sistémicos. Un déficit de la enzima lisosómica α -galactosidasa A debido a una mutación hace que un glucolípido conocido como globotriaosilceramida (conocido también como Gb₃ o trihexósido de ceramida) se acumule dentro de los vasos sanguíneos, otros tejidos y órganos. Esta acumulación conduce a una alteración de su función adecuada. Se dispone de dos terapias de reemplazo enzimático (ERT) para compensar funcionalmente el déficit de la α -galactosidasa. Tanto la agalsidasa alfa (Replagal®, Shire) como la agalsidasa beta (Fabrazyme®, Genzyme) son formas recombinantes de la enzima α -galactosidasa A humana. Estas enzimas son difíciles de fabricar y, por lo tanto, son caras. Recientemente, la contaminación en la planta de Allston de Genzyme, MA, causó una escasez a nivel mundial de agalsidasa beta, y los suministros a los pacientes se racionaron a un tercio de la dosis recomendada.

Como se muestra en el presente documento, las α -galactosidasas ejercen su actividad máxima a los niveles de pH bajos característicos de los lisosomas, mientras que su actividad a niveles de pH más altos se ve comprometida. Por lo tanto, por ejemplo, la α -galactosidasa usada en ERT tendría poca capacidad de hidrolizar glucolípidos galactosilados terminales en el suero de pacientes con la enfermedad de Fabry.

Además, como se muestra adicionalmente en el presente documento, incluso en condiciones lisosómicas, la actividad de las α -galactosidasas se ve comprometida gradualmente, aunque a una tasa más baja que a niveles de pH más altos.

Motivados por la necesidad de resolver la actividad comprometida de las α -galactosidasas, los autores de la presente invención han investigado formas estabilizadas de α -galactosidasa (α -GAL). Más específicamente, los autores de la presente invención han contemplado que una forma estabilizada de la α -galactosidasa podría exhibir una actividad más duradera en general, incluyendo una actividad más duradera en suero. Por lo tanto, los autores de la presente invención han diseñado y preparado con éxito y llevado a la práctica formas estabilizadas de α -galactosidasa nativa y, de hecho, han demostrado que dichas formas estabilizadas exhiben un comportamiento mejorado en cuanto a una mayor actividad y/o una mayor duración de la actividad en condiciones tanto lisosómicas como en un entorno de suero, lo cual proporciona una actividad mejorada de la proteína *in vivo*.

Los autores de la presente invención han demostrado una formación de formas estabilizadas de la α -galactosidasa que exhiben un comportamiento mejorado mediante la reticulación de la α -galactosidasa nativa, a través de la formación de un nuevo enlace covalente entre los monómeros de α -galactosidasa.

Haciendo referencia ahora a los dibujos, las Figuras 1 y 4 muestran la disminución de la actividad enzimática en condiciones lisosómicas para la α -GAL-I humana recombinante vegetal (phr- α -GAL I) y la α -GAL Fabrazyme® y Replagal®. Las Figuras 2 y 3 muestran la disminución de la actividad enzimática en condiciones fisiológicas simuladas o en plasma humano, para las mismas variedades de α -GAL. Las Figuras 2 y 4 muestran que la galactosa disminuye la tasa de disminución de la actividad de la α -GAL.

La Figura 5 muestra agentes de reticulación ejemplares de PEG (polietilenglicol), de acuerdo con realizaciones opcionales de la invención. La Figura 6 representa un dímero de α -GAL reticulado de acuerdo con realizaciones opcionales de la invención.

Las Figuras 7-10 y 37 muestran que phr- α -GAL-I reaccionó con agentes de reticulación ejemplares que comprendían radicales de N-hidroxisuccinimida. La Figura 38 muestra que phr- α -GAL-I reaccionó con agentes de reticulación ejemplares que comprendían grupos carboxilo, después de la activación *in situ* con N-hidroxisuccinimida. Las Figuras 7, 37 y 38 muestran que la reacción con el agente de reticulación dio como resultado la aparición de α -GAL principalmente en una forma dimerica en lugar de en una forma monomérica en condiciones desnaturalizantes, lo que indica que la estructura cuaternaria de la α -GAL se mantenía por reticulación covalente. La FIG. 11 muestra que la α -GAL reticulada conservaba su actividad enzimática.

Las Figuras 12A-12C y 39 muestran que la phr α -GAL-I reticulada exhibe una actividad más duradera que la α -GAL no reticulada en condiciones lisosómicas simuladas. El aumento de la estabilidad es más fuerte para los enlazadores PEG₂₈ y PEG₄₅ que para los enlazadores de PEG más cortos. La Figura 13 muestra que la phr- α -GAL-I reticulada exhibe una actividad más duradera que la α -GAL no reticulada en plasma *in vivo*. Las Figuras 14A-21 muestran que la phr- α -GAL-I reticulada exhibe una actividad potenciada *in vivo* en el bazo, hígado, corazón y riñones. La potenciación de la actividad de α -GAL es más fuerte para los enlazadores de PEG₄₅ que para los enlazadores de PEG más cortos. Las Figuras 15A, 15B y 19 muestran que, aunque la phr- α -GAL-I reticulada exhibe una actividad potenciada *in vivo*, la actividad potenciada no está tan concentrada en el hígado como lo está la actividad de α -GAL Replagal®.

Los resultados anteriores indican que la reticulación de la α -GAL-I humana recombinante vegetal da como resultado un dímero con mejor estabilidad, lo que permite un aumento más eficaz de la actividad de α -GAL cuando se administra *in vivo*.

De manera similar, las Figuras 22-28D muestran que la reticulación de la α -GAL humana recombinante de mamífero da como resultado un dímero ligado de manera covalente (Figuras 22-24B), que exhibe actividad enzimática normal (Figura 25), así como una actividad más duradera en condiciones tanto lisosómicas como en plasma (Figuras 26A-26B) y una mayor actividad *in vivo* en el bazo, hígado, corazón y riñones (Figuras 27A-28D).

De manera similar, las Figuras 29A-33L muestran que la reticulación de la α -GAL II humana recombinante vegetal da como resultado un dímero ligado de manera covalente (Figuras 29-30), que exhibe una actividad más duradera en condiciones tanto lisosómicas como en plasma (Figuras 31A-31B), y una mayor actividad *in vivo* en plasma y en el bazo, hígado, corazón y riñones (Figuras 32A-33L). Como se muestra en las Figuras 33A-33L, la reticulación con un enlazador de PEG₄₅ fue particularmente eficaz para aumentar la actividad *in vivo*.

Estos resultados indican que los efectos ventajosos de la reticulación son aplicables a una diversidad de proteínas α -GAL.

Las Figuras 34A-34C muestran que la reticulación de α -GAL aumenta parámetros de catálisis enzimática de α -GAL, ensancha el intervalo de pH de la actividad de α -GAL y permite la actividad de α -GAL a un pH de aproximadamente 7 o mayor.

Las Figuras 35-36B muestran que la PEGilación sin reticulación no tiene efectos significativos sobre la actividad de α -GAL, lo que indica que los efectos ventajosos de la reticulación se deben específicamente a la reticulación, en lugar de a un efecto de la PEGilación.

Las Figuras 40-44 muestran que la reticulación de α -GAL de acuerdo con las realizaciones de la invención permite una buena reproducibilidad de la estabilidad (Figuras 40A-40B), grado de reticulación covalente (Figuras 41-43F) y propiedades enzimáticas (Figura 44) de la α -GAL reticulada.

Los resultados presentados en el presente documento muestran que las estructuras de proteína multiméricas reticuladas de manera covalente de la α -galactosidasa se caracterizan por una mayor estabilidad y mayor actividad en condiciones fisiológicamente relevantes, en comparación con las formas nativas de la α -galactosidasa.

Por lo tanto, la estructura de proteína multimérica unida de manera covalente puede exhibir una actividad que es mayor que la actividad de una forma nativa de la α -galactosidasa, como resultado de que la actividad de la forma

nativa se degrada más rápidamente a lo largo del tiempo que la actividad de la estructura de proteína multimérica reticulada, que se estabiliza mediante la reticulación covalente.

5 La estructura de proteína multimérica reticulada de manera covalente puede exhibir una actividad que es mayor que la actividad de la forma nativa de la α -galactosidasa, también debido a una mayor actividad inicial (por ejemplo, debido a diferentes parámetros de actividad), es decir, independientemente de cualquier deterioro de la actividad a lo largo del tiempo.

10 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una estructura de proteína multimérica que comprende al menos dos monómeros de α -galactosidasa que están ligados de manera covalente entre sí a través de un radical de unión. De acuerdo con algunas realizaciones, la estructura de proteína multimérica presenta una estabilidad mayor que la de una α -galactosidasa nativa y/o una actividad inicial mayor que la de una α -galactosidasa nativa, como se describe más adelante con detalle.

15 En el presente documento, el término "monómero" con respecto a la α -galactosidasa se refiere a un polipéptido individual de la α -galactosidasa. El polipéptido puede incluir sustituyentes no peptídicos (por ejemplo, uno o más restos de sacárido).

20 En el presente documento, el término "nativa" con respecto a la α -galactosidasa incluye proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica (es decir, al menos una homología del 95 %, opcionalmente al menos una homología del 99 % y opcionalmente del 100 %) con una secuencia de aminoácidos de una proteína α -galactosidasa de origen natural. Una α -galactosidasa nativa puede ser una proteína aislada de una fuente natural, o una proteína producida de manera recombinante (por ejemplo, procedente de células de mamífero, células de plantas, células de levadura, células bacterianas o células de insecto).

25 El término "nativa", cuando se usa en referencia a una estructura cuaternaria de α -galactosidasa (por ejemplo, un dímero de α -galactosidasa) comprende adicionalmente una estructura cuaternaria sustancialmente idéntica a la de una proteína de origen natural.

30 En el presente documento, la frase "proteína de origen natural" se refiere a una proteína en una forma que se produce en la naturaleza (por ejemplo, en un organismo), con respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína, así como la estructura cuaternaria de la proteína si la proteína está en una forma multimérica.

35 Las modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glucosilación) de las proteínas α -galactosidasa de origen natural (por ejemplo, en un organismo que expresa la proteína α -galactosidasa de origen natural) pueden estar presentes, ausentes o modificadas en la forma nativa de la α -galactosidasa a la que se hace referencia en el presente documento. Una forma nativa de la α -galactosidasa (por ejemplo, una α -galactosidasa producida de manera recombinante) puede comprender opcionalmente modificaciones postraduccionales diferentes a las de la α -galactosidasa de origen natural, siempre que la forma nativa de la α -galactosidasa conserve una secuencia de aminoácidos y estructura sustancialmente similar a la de la α -galactosidasa de origen natural, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

40 En el presente documento, la forma nativa de una proteína puede referirse a una estructura monomérica (por ejemplo, un monómero de α -galactosidasa) y/o una estructura multimérica (por ejemplo, un dímero de α -galactosidasa). Por ejemplo, una proteína dimérica puede describirse como una forma nativa de α -galactosidasa, y un polipéptido monomérico en una proteína dimérica puede describirse como una forma nativa del monómero de α -galactosidasa.

45 Opcionalmente, la estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento es una estructura dimérica, como lo es la forma nativa de la α -galactosidasa.

50 Como alternativa, la estructura de proteína multimérica comprende más de dos monómeros de α -galactosidasa. Por ejemplo, la estructura de proteína multimérica puede ser un tetrámero, un hexámero o un octámero que comprende monómeros de α -galactosidasa.

55 Las estructuras de proteína multimérica descritas en el presente documento comprenden enlaces covalentes que unen los monómeros de α -galactosidasa entre sí, y que no existen en la forma nativa de la α -galactosidasa.

60 Opcionalmente, el radical de unión que une los monómeros de α -galactosidasa es un radical que no está presente en una forma nativa de α -galactosidasa (por ejemplo, un radical de unión sintético).

Por lo tanto, por ejemplo, el radical de unión es opcionalmente un radical que se une de manera covalente a una cadena lateral, a un extremo N o a un extremo C, o un radical relacionado con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, un radical de sacárido) de un monómero de α -galactosidasa, así como a una cadena lateral, a un

extremo N o a un extremo C, o a un radical relacionado con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, un radical de sacárido) de otro monómero de α -galactosidasa. A continuación, se describen con detalle en el presente documento ejemplos de dichos radicales de unión.

5 Como alternativa, el radical de unión forma una parte de los monómeros de α -galactosidasa que se están uniendo (por ejemplo, una parte de una cadena lateral, extremo N o extremo C, o un radical relacionado con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, un radical de sacárido) de un monómero de α -galactosidasa, así como de una cadena lateral, un extremo N o un extremo C, o un radical relacionado con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, un radical de sacárido) de otro monómero de α -galactosidasa).

10 Por lo tanto, por ejemplo, el radical de unión puede ser un enlace covalente (por ejemplo, un enlace amida) entre un grupo funcional de una cadena lateral, extremo N, extremo C o radical relacionado con modificaciones postraduccionales de un monómero (por ejemplo, una amina) y un grupo funcional complementario de una cadena lateral, extremo N, extremo C o radical relacionado con modificaciones postraduccionales de otro monómero (por ejemplo, carboxilo), donde dicho enlace covalente está ausente de la forma nativa de la α -galactosidasa. También se contemplan otros enlaces covalentes, tales como, por ejemplo, un enlace éster (entre un grupo hidróxido y un carboxilo); un enlace tioéster; un enlace éter (entre dos grupos hidróxido); un enlace tioéter; un enlace anhídrido (entre dos carboxilos); un enlace tioamida; un enlace carbamato o tiocarbamato.

20 Opcionalmente, el radical de unión está desprovisto de un enlace disulfuro. Sin embargo, dentro del alcance de esta realización de la invención se encuentra un radical de unión que incluye un enlace disulfuro en una posición que no forma un enlace entre monómeros (por ejemplo, la escisión de los enlaces disulfuro no escinde la unión entre los monómeros). Una posible ventaja del radical de unión desprovisto de un enlace disulfuro es que no es susceptible de escisión en condiciones reductoras suaves, como lo son los enlaces disulfuro.

25 Opcionalmente, el radical de unión es un radical no peptídico (por ejemplo, el radical de unión no consiste en un enlace amida, un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un oligopéptido o un polipéptido).

30 Como alternativa, el radical de unión puede ser, o puede comprender, un radical peptídico (por ejemplo, un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un oligopéptido o un polipéptido).

Opcionalmente, el radical de unión no es simplemente una extensión lineal de cualquiera de los monómeros de α -galactosidasa unidos (es decir, el extremo N y extremo C del radical peptídico no están unidos directamente al extremo C o extremo N de cualquiera de los monómeros de α -galactosidasa).

35 Como alternativa, el radical de unión está formado por unión covalente directa de un extremo N de un monómero de α -galactosidasa con un extremo C de otro monómero de α -galactosidasa, para producir un polipéptido fusionado. Dicho polipéptido no será una forma nativa de α -galactosidasa, aunque puede comprender dos monómeros de α -galactosidasa esencialmente en su forma nativa.

40 Sin embargo, la unión covalente de los monómeros de α -galactosidasa descritos en el presente documento está preferentemente en una forma distinta de la unión directa de un extremo N a un extremo C.

45 El radical de unión también se denomina en el presente documento radical de reticulación. En el presente documento, la unión de monómeros de α -galactosidasa mediante un radical de unión se denomina "reticulación".

El radical de reticulación puede ser un enlace covalente, un grupo o átomo químico (por ejemplo, un grupo C(=O)-O-, -O-, -S-, NR-, -N=N-, -NH-C(=O)-NH-, y similar) o un radical puente (compuesto de una cadena de grupos químicos).

50 Un radical puente puede ser, por ejemplo, un grupo polimérico u oligomérico.

El radical puente es un radical multifuncional (por ejemplo, birradical, trirradical, etc.) que está unido a cadenas laterales, radicales relacionados con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, radicales de sacárido) y/o extremos (es decir, extremo N, extremo C) de dos o más de los monómeros.

60 Como se ilustra en el presente documento en la sección de Ejemplos, los radicales de unión relativamente cortos (por ejemplo, PEG₂, PEG₄, PEG₅) pueden ser menos eficaces que los radicales de unión más largos (por ejemplo, PEG₂₈, PEG₄₅) en las reticulaciones entre diferentes monómeros de α -galactosidasa.

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones, el radical de unión no es un enlace covalente, un átomo o grupo químico, sino que más bien es un radical puente.

65 Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones, el radical de unión tiene una longitud de al menos 10 átomos, opcionalmente una longitud de al menos 20 átomos, opcionalmente una longitud de al menos 30 átomos,

opcionalmente una longitud de al menos 50 átomos, opcionalmente una longitud de al menos 100 átomos y opcionalmente una longitud de al menos 200 átomos.

En el presente documento, la longitud de un radical de unión (cuando se expresa como un número de átomos) se refiere a la longitud de la estructura del radical de unión, es decir, el número de átomos que forman una cadena lineal entre los restos de cada uno de dos monómeros unidos a través del radical de unión.

Opcionalmente, el radical de unión está por debajo de un determinado tamaño, para impedir una parte del radical de unión innecesariamente excesiva en la proteína reticulada formada, que podría interferir con la función de la proteína.

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones, cada radical de unión se caracteriza por un peso molecular de menos de 20 KDa, opcionalmente menos de 10 KDa, opcionalmente menos de 5 KDa y opcionalmente menos de 3 KDa.

Para facilitar la reticulación, el radical de unión es de manera opcional sustancialmente flexible, siendo los enlaces en la estructura del radical de unión en su mayor parte rotacionalmente libres, por ejemplo, enlaces sencillos que no están acoplados a un doble enlace (por ejemplo, a diferencia de un enlace amida) y no estando la rotación impedida estéricamente. Opcionalmente al menos el 70 %, opcionalmente al menos el 80 % y opcionalmente al menos el 90 % (por ejemplo, el 100 %) de los enlaces en la estructura del radical de unión es rotacionalmente libre.

En algunas realizaciones, el radical de unión comprende una cadena de poli(alquilenglicol).

La frase "poli(alquilenglicol)", como se usa en el presente documento, incluye una familia de polímeros de poliéter que comparte la siguiente fórmula general: $-O-[(CH_2)_m-O]_n-$, en la que m representa el número de grupos metileno presente en cada unidad de alquilenglicol, y n representa el número de unidades de repetición y, por lo tanto, representa el tamaño o la longitud del polímero. Por ejemplo, cuando m = 2, el polímero se denomina polietilenglicol y cuando m = 3, el polímero se denomina polipropilenglicol.

En algunas realizaciones, m es un número entero mayor que 1 (por ejemplo, m = 2, 3, 4, etc.).

Opcionalmente, m varía entre las unidades de la cadena de poli(alquilenglicol). Por ejemplo, una cadena de poli(alquilenglicol) puede comprender tanto unidades de etilenglicol (m = 2) como de propilenglicol (m = 3) unidas entre sí.

Opcionalmente, el poli(alquilenglicol) comprende al menos dos grupos funcionales (por ejemplo, como se describe en el presente documento), formando cada grupo funcional un enlace covalente con uno de los monómeros de α -galactosidasa. Los grupos funcionales son opcionalmente grupos terminales del poli(alquilenglicol), de tal manera que toda la longitud del poli(alquilenglicol) se encuentra entre los dos grupos funcionales.

La frase "poli(alquilenglicol)" también incluye análogos del mismo, en los que el átomo de oxígeno se reemplaza por otro heteroátomo tal como, por ejemplo, S, -NH- y similares. Este término incluye adicionalmente derivados de los anteriores en los que se han sustituido uno o más de los grupos metileno que componen el polímero. Los sustituyentes ejemplares en los grupos metileno incluyen, pero sin limitación, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, oxo, tiol y tioalcoxi y similares.

La frase "unidad de alquilenglicol", como se usa en el presente documento, incluye un grupo $-(CH_2)_m-O-$ o un análogo del mismo, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que forma la cadena estructural del poli(alquilenglicol), en el que el $(CH_2)_m$ (o su análogo) está unido a un heteroátomo que pertenece a otra unidad de alquilenglicol o a un radical monomérico de α -galactosidasa (en casos de una unidad terminal), y el O (o un análogo de heteroátomo del mismo) está unido al $(CH_2)_m$ (o su análogo) de otra unidad de alquilenglicol, o a un grupo funcional que forma un enlace con un monómero de α -galactosidasa.

Una unidad de alquilenglicol puede estar ramificada, de tal manera que está ligada a tres o más unidades de alquilenglicol adyacentes, donde cada una de las 3 o más unidades de alquilenglicol adyacentes son parte de una cadena de poli(alquilenglicol). Dicha unidad ramificada de alquilenglicol está ligada a través del heteroátomo de la misma a una unidad de alquilenglicol adyacente, y cada uno de los heteroátomos de las unidades de alquilenglicol adyacentes restantes está ligado a un átomo de carbono de la unidad de alquilenglicol ramificada. Además, un heteroátomo (por ejemplo, nitrógeno) puede unirse a más de un átomo de carbono de una unidad de alquilenglicol de la que forma parte, formando de este modo una unidad de alquilenglicol ramificada (por ejemplo, $[(-CH_2)_m]_2N-$ y similares).

En realizaciones ejemplares, al menos el 50 % de las unidades de alquilenglicol son idénticas, por ejemplo, comprenden los mismos heteroátomos y los mismos valores de m unas que otras. Opcionalmente al menos el 70 %, opcionalmente al menos el 90 % y opcionalmente el 100 % de las unidades de alquilenglicol son idénticas. En

realizaciones ejemplares, los heteroátomos unidos a las unidades idénticas de alquilenglicol son átomos de oxígeno. En realizaciones ejemplares adicionales, m es 2 para las unidades idénticas.

5 En una realización, el enlazador es un enlazador de cadena lineal, sencilla, siendo preferentemente polietilenglicol (PEG).

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "poli(etilenglicol)" describe un poli(alquilenglicol), como se define anteriormente en el presente documento, en el que al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 % y preferentemente el 100 % de las unidades de alquilenglicol son $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$. De manera similar, la frase "unidades de etilenglicol" se define en el presente documento como unidades de $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$.

De acuerdo con realizaciones opcionales, el radical de unión comprende un poli(etilenglicol) o análogo del mismo, que tienen una fórmula general:

15
$$-\text{X}_1-(\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y})_n-\text{X}_2-$$

en la que cada uno de X_1 y X_2 es un grupo funcional (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que forma un enlace covalente con al menos un monómero de α -galactosidasa;

20 Y es O, S o NR_5 (opcionalmente O);

n es un número entero, opcionalmente de 1 a 200 (opcionalmente de 5 a 150 y opcionalmente de 40 a 70), aunque también se contemplan valores mayores de n; y

cada uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, hidroxilo, oxo, tiol y tioalcoxi.

25 En algunas realizaciones, n es al menos 5, opcionalmente al menos 8, opcionalmente al menos 15 y opcionalmente al menos 25 y opcionalmente al menos 40.

En algunas realizaciones, n no es más de 200, opcionalmente no más de 150 y opcionalmente no más de 70.

30 El poli(etilenglicol) o análogo del mismo puede comprender opcionalmente un copolímero, por ejemplo, en el que las unidades $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ en la fórmula anterior no son todas idénticas entre sí.

35 En algunas realizaciones, al menos el 50 % de las unidades $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ son idénticas. Opcionalmente, al menos el 70 %, opcionalmente al menos el 90 % y opcionalmente el 100 % de las unidades $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ son idénticas.

40 Opcionalmente, el radical de unión está ramificado, por ejemplo, de tal manera que para una o más unidades $\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y}$ en la fórmula anterior, al menos de uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 es $-(\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-\text{Y})_p-\text{X}_3-$, donde R_1-R_4 e Y son como se define anteriormente en el presente documento, p es un número entero como se define en el presente documento para n (por ejemplo, de 1 a 200) y X_3 es como se define en el presente documento para X_1 y X_2 .

Los grupos funcionales pueden formar opcionalmente un enlace tal como, pero sin limitación, un enlace amina, un enlace amida, un enlace éster y/o un enlace éter.

45 Por ejemplo, el grupo funcional puede comprender opcionalmente un grupo carbonilo que forma un enlace amida con un átomo de nitrógeno en un polipéptido (por ejemplo, en un resto de lisina o extremo N) o un enlace éster con un átomo de oxígeno en un polipéptido (por ejemplo, en un resto de serina, treonina o tirosina).

50 Como alternativa o adicionalmente, el grupo funcional opcionalmente puede comprender un heteroátomo (por ejemplo, N, S, O) que forma un enlace amida, enlace éster o enlace tioéster con un grupo carbonilo en un polipéptido (por ejemplo, en un resto de glutamato o aspartato o en un extremo C).

55 Como alternativa o de manera adicional, el grupo funcional puede comprender un grupo alquilo o arilo unido a un polipéptido (por ejemplo, a un heteroátomo en el polipéptido).

60 De manera alternativa o adicional, el grupo funcional puede comprender opcionalmente un átomo de nitrógeno que forma un enlace amina con un grupo alquilo en un monómero de α -galactosidasa, o un monómero de α -galactosidasa puede opcionalmente comprender un átomo de nitrógeno que forma un enlace amina con un grupo alquilo en el grupo funcional. Dicho enlace amina puede formarse por aminación reductora (por ejemplo, como se describe más adelante en el presente documento).

En algunas realizaciones, al menos uno de los grupos funcionales forma un enlace amida con un polipéptido (por ejemplo, con un resto de lisina en su interior).

65 Los grupos funcionales pueden ser idénticos entre sí o diferentes.

En algunas realizaciones, al menos uno de los grupos funcionales está unido a una funcionalidad de un polipéptido (por ejemplo, un grupo amino de un resto de lisina o extremo N), y al menos uno de los grupos funcionales está unido a una funcionalidad diferente de un polipéptido (por ejemplo, un grupo tiol de un resto de cisteína).

5 De acuerdo con realizaciones opcionales, la estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento exhibe una alta estabilidad en condiciones plasmáticas humanas y/o en condiciones lisosómicas. Como se usa en el presente documento, la frase “condiciones plasmáticas humanas” se refiere a plasma humano como medio, a una temperatura de 37 °C.

10 Como se usa en el presente documento, la frase “condiciones lisosómicas” se refiere a una solución acuosa que tiene un pH de 4,6 como medio (por ejemplo, un tampón fosfato citrato descrito en el presente documento), a una temperatura de 37 °C.

15 La mejor estabilidad en condiciones lisosómicas es ventajosa debido a que el lisosoma es una diana para la terapia de reemplazo para la α -galactosidasa, ya que los lisosomas son la localización normal de la actividad α -galactosidasa en el cuerpo, y las condiciones lisosómicas (por ejemplo, pH ácido) representan condiciones óptimas para la actividad de la α -galactosidasa.

20 Sin querer ligarse a ninguna teoría particular, se piensa que la mejor estabilidad en condiciones similares al suero (por ejemplo, las condiciones plasmáticas humanas descritas en el presente documento) es también ventajosa porque la α -galactosidasa estable en la sangre puede actuar sobre metabolitos (por ejemplo, Gb₃) presentes en la sangre como consecuencia de la salida desde las células. Una estructura de proteína multimérica activa en suero podría opcionalmente ser eficaz en la eliminación y prevención de los depósitos de glucoesfingolípidos dentro de las paredes de los vasos sanguíneos que promueven la inflamación [Bodary *et al.*, TCM 17(4): 129-133]. Por ejemplo, 25 en la enfermedad de Fabry, la patogénesis principal resulta de la acumulación de Gb₃ en el endotelio vascular, lo que conduce a una oclusión vascular de los vasos pequeños, isquemia e infarto de estos vasos e isquemia e infarto del riñón, corazón y cerebro [Desnick *et al.*, 2003, Annals of Internal Medicine, 138(4): 338-346]. Adicionalmente, la mayor estabilidad en suero puede anular la necesidad de tráfico lisosómico. ERT puede, por lo tanto, volverse mucho más accesible, ya que pueden emplearse sistemas de hospedadores rentables fuertes, por ejemplo, plantas.

30 De acuerdo con realizaciones opcionales, la alta estabilidad de la estructura de proteína multimérica en condiciones plasmáticas humanas es tal que la estructura de proteína multimérica exhibe, después de someterse a condiciones plasmáticas humanas durante una hora, una actividad α -galactosidasa que es al menos un 10 % mayor, opcionalmente un 20 % mayor, opcionalmente el 50 % mayor, y opcionalmente un 100 % mayor, que una actividad 35 α -galactosidasa de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a las condiciones plasmáticas humanas durante una hora.

40 De manera alternativa o adicional, la alta estabilidad de la estructura de proteína multimérica en condiciones plasmáticas humanas es tal que la actividad α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica disminuye más lentamente en condiciones plasmáticas humanas que la actividad correspondiente de la α -galactosidasa nativa. Opcionalmente, la estructura de proteína multimérica exhibe una actividad que disminuye después de someter la 45 estructura de proteína a condiciones plasmáticas humanas durante una hora en un porcentaje que es al menos un 10 % menor, opcionalmente un 20 % menor, opcionalmente un 50 % menor y opcionalmente un 80 % menor, que el porcentaje que disminuye la actividad correspondiente de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a condiciones plasmáticas humanas durante una hora.

50 Debe entenderse que, en el presente documento, una disminución que es un “10 % menor” que una disminución del 50 % se refiere a una disminución del 45 % (siendo 45 un 10 % menor que 50), y no a una disminución del 40 % (50 %-10 %).

55 De manera alternativa o adicional, la alta estabilidad de la estructura de proteína multimérica en condiciones plasmáticas humanas es tal que la actividad α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones plasmáticas humanas durante una hora, y opcionalmente durante 2, 4 o incluso 6 horas.

60 Como se usa en el presente documento, la frase “sustancialmente sin cambios” se refiere a un nivel (por ejemplo, de actividad) que permanece en un intervalo del 50 % al 150 % del nivel inicial, y opcionalmente un nivel que permanece al menos en un 60 %, opcionalmente al menos en un 70 %, opcionalmente al menos en un 80 % y opcionalmente al menos en un 90 % del nivel inicial.

Opcionalmente, la alta estabilidad de la estructura de proteína multimérica en condiciones lisosómicas es tal que la estructura de proteína multimérica exhibe, después de someterse a condiciones lisosómicas durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, un día, dos días, tres días, una semana), una actividad α -galactosidasa que es al menos un 10 % mayor, opcionalmente un 20 % mayor, opcionalmente un 50 % mayor y opcionalmente un 100 %

mayor que la actividad de la α -galactosidasa nativa después de someter la α -galactosidasa nativa a las condiciones lisosómicas durante el mismo periodo de tiempo predeterminado.

5 De manera alternativa o adicional, la alta estabilidad de la estructura de proteína multimérica en condiciones lisosómicas es tal que una actividad α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica disminuye más lentamente en condiciones lisosómicas que una actividad correspondiente de la α -galactosidasa nativa. Opcionalmente, la estructura de proteína multimérica exhibe una actividad que disminuye después de someter la estructura de proteína a condiciones lisosómicas durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo un día, 10 2 días, 3 días, una semana), en un porcentaje que es al menos un 10 % menor, opcionalmente un 20 % menor, opcionalmente un 50 % menor y opcionalmente un 80 % menor, que el porcentaje que disminuye la actividad correspondiente de la alfa-galactosidasa nativa después de someter la alfa-galactosidasa nativa a condiciones lisosómicas durante el mismo periodo de tiempo.

15 De manera alternativa o adicional, la alta estabilidad de la estructura de proteína multimérica en condiciones lisosómicas es tal que una actividad α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones lisosómicas durante un día, durante 2 días, durante 3 días, durante una semana, durante dos semanas y/o durante un mes.

20 Como se ilustra en la sección de Ejemplos del presente documento, además de exhibir más estabilidad a lo largo del tiempo, la estructura de proteína multimérica puede exhibir parámetros de actividad α -galactosidasa que son diferentes de los de la α -galactosidasa nativa.

25 Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones opcionales, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por exhibir, independientemente de cualquier degradación de actividad a lo largo del tiempo, una actividad α -galactosidasa que es mayor que una actividad α -galactosidasa de una forma nativa de la proteína. Opcionalmente, la actividad es un 10 % mayor y, opcionalmente, un 20 % mayor, que la actividad correspondiente de la forma nativa.

30 Para caracterizar dicha actividad, la actividad se determina preferentemente de manera inmediata (por ejemplo, antes de que haya transcurrido 1 hora, antes de que hayan transcurrido 15 minutos) después de someter la α -galactosidasa nativa o la estructura de proteína multimérica a condiciones (por ejemplo, como se describe en el presente documento) en las cuales la actividad disminuye sustancialmente, de tal manera que la actividad medida reflejará la actividad por sí misma y no un grado de estabilidad.

35 Opcionalmente, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por exhibir una actividad α -galactosidasa en condiciones lisosómicas que es mayor que una actividad correspondiente de la α -galactosidasa nativa.

40 De manera alternativa o adicional, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por exhibir una actividad α -galactosidasa en condiciones fisiológicas simuladas a un pH neutro que es mayor que una actividad correspondiente de la α -galactosidasa nativa. Las condiciones fisiológicas simuladas comprenden una solución acuosa (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) a una temperatura de 37 °C. El pH es opcionalmente 7. Como alternativa, el pH es de 7,4.

45 La actividad α -galactosidasa descrita en el presente documento es una actividad biológica que es característica de la α -galactosidasa (por ejemplo, una actividad catalítica característica de la α -galactosidasa, tal como hidrólisis de un radical α -galactosil terminal de un sustrato).

En algunas realizaciones, la actividad catalítica de la α -galactosidasa se caracteriza por una velocidad de catálisis a saturación (es decir, un valor $V_{m\acute{a}x}$).

50 De manera alternativa, la actividad α -galactosidasa es una actividad terapéutica (por ejemplo, una actividad enzimática que tiene un efecto terapéutico), tal como una actividad terapéutica en el contexto de la enfermedad de Fabry. Opcionalmente, la actividad terapéutica se determina en animales experimentales (por ejemplo, ratones con enfermedad de Fabry) y, opcionalmente, en pacientes humanos con enfermedad de Fabry.

55 Un experto en la materia conocerá técnicas para determinar la actividad α -galactosidasa. Típicamente, la α -galactosidasa (es decir, la forma nativa o una estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento) se pone en contacto con un compuesto reconocido en la técnica como sustrato de la α -galactosidasa, y después se determina el grado de actividad de un modo cuantitativo. En la técnica se conocen compuestos que permiten la detección particularmente conveniente de la actividad α -galactosidasa y se encuentran disponibles en el mercado.

60 En algunas realizaciones, la actividad α -galactosidasa se determina ensayando la hidrólisis de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (por ejemplo, como se describe en la sección de Ejemplos del presente documento).

65 En algunas realizaciones, la actividad α -galactosidasa se determina ensayando la hidrólisis de p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (por ejemplo, como se describe en la sección de Ejemplos del presente documento).

5 Cuando se compara una actividad de una estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento con una actividad de la α -galactosidasa nativa, la α -galactosidasa nativa comprende preferentemente monómeros de α -galactosidasa sustancialmente idénticos (por ejemplo, con respecto a la secuencia de aminoácidos y el patrón de glucosilación) a los monómeros de α -galactosidasa de la estructura multimérica.

10 De acuerdo con algunas realizaciones, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por una semivida en circulación en un sistema fisiológico (por ejemplo, sangre, suero y/o plasma de un ser humano o animal de laboratorio) que es mayor (por ejemplo, al menos un 20 %, al menos un 50 % mayor, al menos un 100 % mayor, al menos un 400 % mayor o al menos un 900 % mayor) que una semivida en circulación de la α -galactosidasa nativa.

15 Una semivida en circulación aumentada puede asociarse opcionalmente con una mayor estabilidad *in vitro* (por ejemplo, como se describe en el presente documento), una mayor estabilidad *in vivo* (por ejemplo, resistencia al metabolismo) y/o junto con otros factores (por ejemplo, eliminación renal reducida).

20 Las semividas de circulación pueden determinarse cogiendo muestras (por ejemplo, muestras sanguíneas, muestras tisulares) de sistemas fisiológicos (por ejemplo, seres humanos, animales de laboratorio) a diversos intervalos y determinando el nivel de α -galactosidasa en la muestra, usando técnicas conocidas en este campo.

25 Opcionalmente, la semivida se calcula como una semivida terminal (por ejemplo, como se describe en la sección de Ejemplos), donde la semivida es el tiempo necesario para que una concentración (por ejemplo, una concentración sanguínea) disminuya en un 50 % después de haber alcanzado el seudoequilibrio de distribución. La semivida terminal puede calcularse a partir de una parte lineal terminal de una curva de tiempo frente al log de la concentración, por regresión lineal de la curva de tiempo frente al log de la concentración (véase, por ejemplo, Toutain y Bousquet-Melou [J Vet Pharmacol Ther 2004, 27: 427-39]). Por lo tanto, la semivida terminal es una medida de la disminución de la concentración plasmática de fármaco debida a la eliminación del fármaco y no de la disminución debida a otras razones, y no es necesariamente el tiempo necesario para que la cantidad del fármaco administrado se reduzca a la mitad.

30 La determinación del nivel de α -galactosidasa (por ejemplo, la estructura de proteína multimérica o la α -galactosidasa nativa) puede comprender la detección de la presencia física de α -galactosidasa (por ejemplo, mediante un anticuerpo contra α -galactosidasa) y/o la detección del nivel de una actividad α -galactosidasa (por ejemplo, como se describe en el presente documento).

35 De acuerdo con algunas realizaciones, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por una actividad α -galactosidasa en un órgano (por ejemplo, bazo, corazón, riñón, cerebro, hígado) después de la administración (por ejemplo, administración intravenosa) de la estructura de proteína a un vertebrado (por ejemplo, un ser humano, un ratón), por ejemplo, un vertebrado con un déficit de α -galactosidasa (por ejemplo, un paciente humano con la enfermedad de Fabry, un ratón con la enfermedad de Fabry). Opcionalmente, la actividad α -galactosidasa en el órgano es mayor que la actividad α -galactosidasa de la α -galactosidasa nativa en el órgano, después de una administración equivalente a un vertebrado.

40 La actividad en un órgano puede ser una función de la captación de la α -galactosidasa y/o la retención de la actividad α -galactosidasa después de la captación.

45 Opcionalmente, la actividad α -galactosidasa en el órgano se determina 2 horas después de la administración, y opcionalmente 24 horas, opcionalmente 3 días, opcionalmente 7 días y opcionalmente 14 días después de la administración.

50 Un aumento de la actividad de la α -galactosidasa en el hígado en algunos casos puede estar asociada con una menor actividad en otras partes del cuerpo y, por lo tanto, con un efecto biológico reducido de la α -galactosidasa.

55 Por lo tanto, en algunas realizaciones, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por una mayor actividad α -galactosidasa en un órgano distinto del hígado. Como ejemplos de órganos incluyen el bazo, el corazón y los riñones.

60 En algunas realizaciones, la estructura de proteína multimérica se caracteriza por una mayor actividad α -galactosidasa en un órgano después de la administración (como se describe en el presente documento) que es al menos un 20 % mayor, opcionalmente al menos un 50 % mayor, opcionalmente al menos un 100 % mayor, y opcionalmente al menos un 300 % mayor, que la actividad de la α -galactosidasa nativa después de una administración equivalente. Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, los autores de la presente invención han contemplado y preparado satisfactoriamente y llevado a la práctica formas estabilizadas de α -galactosidasa mediante estructuras multiméricas de monómeros de α -galactosidasa reticulados.

65 Opcionalmente, la α -galactosidasa es una α -galactosidasa humana (por ejemplo, una α -galactosidasa humana recombinante), por ejemplo, para facilitar la biocompatibilidad óptima para la administración a sujetos humanos. La

α -galactosidasa humana se encuentra disponible en el mercado, por ejemplo, como Replagal® (agalsidasa alfa, Shire) y Fabrazyme® (agalsidasa beta, Genzyme).

5 En el presente documento, "α-galactosidasa humana" se refiere a una α-galactosidasa que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica (por ejemplo, como se describe anteriormente en el presente documento) a una secuencia de aminoácidos de una proteína α-galactosidasa que se produce de manera natural en seres humanos.

10 En algunas realizaciones, la α-galactosidasa es una α-galactosidasa recombinante vegetal. Las α-galactosidasas ejemplares incluyen α-galactosidasas humanas recombinantes vegetales.

15 Como ejemplos de α-GAL se incluyen, sin limitación, α-GAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. Opcionalmente, la α-GAL tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

20 Como se usa en el presente documento, "α-galactosidasa" se refiere a cualquier proteína que exhibe una actividad enzimática (por ejemplo, hidrólisis) hacia radicales de galactosa en Gb₃ (por ejemplo, α-galactosidasa A). Opcionalmente, "α-galactosidasa" se refiere a E.C. 3.2.1.22.

25 La α-galactosidasa de las realizaciones de la invención puede purificarse (por ejemplo, de tejido de plantas o animales) o generarse mediante tecnología de ADN recombinante.

30 Como se describe en el presente documento, la actividad de α-galactosidasa en suero puede ser muy ventajosa, por ejemplo, para reducir niveles de Gb₃ en suero.

35 Por lo tanto, en algunas realizaciones, la α-galactosidasa es una α-galactosidasa alcalina.

40 Como se usa en el presente documento, la frase "α-galactosidasa alcalina" se refiere a α-GAL caracterizada por la capacidad de hidrolizar los radicales de α-galactosa ligados al extremo de oligosacáridos que contienen galactosa en condiciones de pH neutro a básico (por ejemplo, a aproximadamente pH 7-7,5), particularmente a un pH en suero normal (por ejemplo, aproximadamente 7,35-7,45).

45 Se apreciará que una α-GAL alcalina de algunas realizaciones de la invención puede ser activa en condiciones de pH neutras a básicas, pero también puede presentar actividad en condiciones de pH ácidas (es decir, a aproximadamente 4,6).

50 En una realización específica, la enzima es activa en condiciones de pH de ácido a básico (es decir, aproximadamente pH 4,2-7,5).

55 En otra realización específica más, la enzima es activa a un pH de aproximadamente 6,5-7,5.

60 En la Solicitud de Patente US 20070036883, documento WO03/097791 y en PCT/IL2010/000956, se proporcionan ejemplos específicos de α-galactosidasas alcalinas que pueden usarse de acuerdo con las presentes enseñanzas.

65 Por lo tanto, la α-galactosidasa alcalina puede ser un miembro de la familia de plantas seleccionada del grupo que consiste en las familias *Cucurbitaceae*, *Lamiaceae*, *Piperaceae*, *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Cruciferae* y *Gramineae*.

De acuerdo con una realización específica, la α-galactosidasa alcalina es de melón.

70 P.-R. Gaudreault y JA Webb han descrito en diversas publicaciones (tales como "Alkaline alpha-galactosidase in leaves of Cucurbita pepo", Plant Sci. Lett. 24, 281-288, 1982, "Partial purification and properties of an alkaline alpha-galactosidase from mature leaves of Cucurbita pepo", Plant Physiol., 71, 662-668, 1983, y "Alkaline alpha-galactosidase activity and galactose metabolism in the family Cucurbitaceae", Plant Science, 45, 71-75, 1986), una nueva α-galactosidasa purificada de plantas jóvenes de *Cucurbita pepo*, que tiene una actividad óptima en condiciones alcalinas (pH 7,5). Además de la α-galactosidasa alcalina, también pueden indicarse tres formas ácidas de la enzima, y se descubrieron preferencias de sustrato distintas para las formas ácida y alcalina.

75 Se ha observado actividad α-galactosidasa a pH alcalino en otros tejidos de cucurbitáceas, tales como los pedicelos del fruto del pepino, fruto joven de calabaza y fruto joven de melón ("Melons: Biochemical and Physiological Control of Sugar Accumulation", En: Encyclopedia of Agricultural Science, vol. 3, págs. 25-37, Arntzen, C. J., et al., eds. Academic Press, Nueva York, 1994).

80 Bachmann et al. ("Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L.", Plant Physiology 105: 1335-1345, 1994) afirman que en las plantas de *Ajuga reptans* (consuelda común), un translocador de estaquiosa de la familia *Lamiaceae* no relacionada también contiene una α-galactosidasa alcalina. Esta enzima se caracterizó parcialmente y se descubrió que tenía alta afinidad por estaquiosa. Además, las hojas de la planta

Peperomia camptotricha L., de la familia *Piperaceae*, muestran actividad α -galactosidasa a pH alcalino, lo que sugiere que también contienen una enzima α -galactosidasa alcalina (Madore, M., "Catabolism of raffinose family oligosaccharides by vegetative sink tissues", En: Carbon Partitioning and Source-Sink Interactions in Plants, Madore, M. and Lucas, W. J. (eds.) págs. 204-214, 1995, American Society of Plant Physiologists, Maryland). De manera similar, Gao y Schaffer (Plant Physiol. 1999; 1 19: 979-88) han descrito una actividad α -galactosidasa con un pH alcalino óptimo en extractos brutos de tejidos de una variedad de especies que incluyen miembros de las familias *Cucurbit* y *Coleus* (*Lamiaceae*).

Se proporcionan ejemplos específicos de secuencias de α -galactosidasa alcalina de plantas en las SEQ ID NO: 4, 5 y 13 (*Cucumis melo*), 6 (*T. tetragonioides*), 7 y 12 (*Cucumis sativus*), 8 y 9 (*Zea mays*), 10 (*Oruza sativa*), 11 (*Pisum sativum*) y 14 (*Coffea arabica*).

En algunas realizaciones, la α -galactosidasa es una α -galactosidasa ácida.

Como se usa en el presente documento, " α -galactosidasa ácida" se refiere a una α -galactosidasa caracterizada por una capacidad de hidrolizar radicales de α -galactosidasa unidos al extremo de oligosacáridos que contienen galactosa en condiciones de pH ácidas (por ejemplo, a aproximadamente pH 4,2-5), tales como las que existen en un lisosoma.

La α -galactosidasa de realizaciones de la invención puede ser de cualquier fuente humana, animal o vegetal, siempre que después de la administración *in vivo* no se induzca una reacción inmunológica excesivamente adversa (por ejemplo, planta contra ser humano).

Para reducir la reacción inmunológica, puede coadministrarse una preparación de α -galactosidasa no humana (por ejemplo, de α -galactosidasa vegetal) con una α -galactosidasa humana (es decir, α -galactosidasa humana ácida).

Opcionalmente, la estructura de proteína multimérica comprende adicionalmente al menos un radical de manosa-6-fosfato (M6P). El radical (o radicales) de M6P puede ligarse a uno o más de los monómeros de α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica (por ejemplo, mediante un enlazador).

En el documento WO 2009/024977 se describen técnicas y reactivos para introducir radicales que contienen M6P en una biomolécula (por ejemplo, un polipéptido).

Como se ilustra en la sección de Ejemplos del presente documento, una estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento puede prepararse convenientemente haciendo reaccionar la α -galactosidasa con un agente de reticulación.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona un proceso para la preparación de una estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento. El proceso comprende hacer reaccionar la α -galactosidasa para introducir al menos un radical de unión que une de manera covalente al menos dos monómeros de α -galactosidasa.

Opcionalmente, el radical de unión es un enlace (por ejemplo, un enlace amida, un enlace disulfuro) que une un monómero de α -galactosidasa con otro monómero de α -galactosidasa. Opcionalmente, el enlace se introduce usando condiciones y/o reactivos adecuados. Por ejemplo, en la técnica se conocen reactivos que son adecuados para la formación de un enlace amida a partir de un grupo de ácido carboxílico y un grupo amina.

Opcionalmente, el radical de unión es un radical que no procede de una parte de la α -galactosidasa. Por ejemplo, el radical de unión puede ser un oligómero, un polímero, un resto de una molécula pequeña (por ejemplo, un aminoácido).

En algunas realizaciones, el radical de unión se introduce haciendo reaccionar la α -galactosidasa con un agente de reticulación que comprende el radical de unión (por ejemplo, como se describe en el presente documento) y al menos dos grupos reactivos.

Opcionalmente, la α -galactosidasa reacciona en condiciones en las que la α -galactosidasa nativa está en una forma dimérica.

En algunas realizaciones, el agente de reticulación reacciona con la α -galactosidasa a una proporción molar en un intervalo de 5:1 a 500:1 (agente de reticulación:monómero de α -galactosidasa), opcionalmente en un intervalo de 50:1 a 400:1, y opcionalmente en un intervalo de 75:1 a 300:1 (por ejemplo, aproximadamente 100:1, aproximadamente 200:1).

El proceso comprende opcionalmente además purificar la proteína reticulada, por ejemplo, retirando el exceso de agente de reticulación. Pueden usarse métodos de purificación comunes, tales como diálisis y/o ultrafiltración, usando membranas de corte apropiado y/o etapas cromatográficas adicionales, incluyendo cromatografía de

exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba y similares.

El grupo reactivo se selecciona para que sea adecuado para someterse a una reacción química que conduzca a la formación de un enlace con una funcionalidad complementaria en el monómero de α -galactosidasa. Opcionalmente, cada grupo reactivo es capaz de formar un enlace covalente entre el radical de unión descrito en el presente documento y al menos un polipéptido (por ejemplo, para formar un grupo funcional unido al polipéptido, como se describe en el presente documento).

Los grupos reactivos de un agente de reticulación pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

Como se usa en el presente documento, la frase "grupo reactivo" describe un grupo químico que es capaz de someterse a una reacción química que típicamente conduce a la formación de un enlace. El enlace, de acuerdo con las presentes realizaciones, es preferentemente un enlace covalente (por ejemplo, para cada uno de los grupos reactivos). Las reacciones químicas que conducen a la formación de un enlace incluyen, por ejemplo, sustituciones nucleófilas y electrófilas, reacciones de adición nucleófilas y electrófilas, alquilaciones, reacciones de adición-eliminación, reacciones de cicloadición, reacciones de transposición y cualquier otra reacción orgánica conocida que implique un grupo funcional, así como combinaciones de las mismas.

El grupo reactivo puede comprender opcionalmente una parte no reactiva (por ejemplo, un alquilo) que puede servir, por ejemplo, para unir una parte reactiva del grupo reactivo a un radical de unión (por ejemplo, poli(alquilenglicol) o análogo del mismo) descrito en el presente documento.

El grupo reactivo se selecciona preferentemente para permitir su conjugación con la α -galactosidasa. Los grupos reactivos ejemplares incluyen, pero sin limitación, carboxilato (por ejemplo, $-\text{CO}_2\text{H}$), tiol ($-\text{SH}$), amina ($-\text{NH}_2$), halo, azida ($-\text{N}_3$), isocianato ($-\text{NCO}$), isotiocianato ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), carbonilo (por ejemplo, aldehído), maleimida, sulfato, fosfato, sulfonilo (por ejemplo, mesilo, tosilo), etc., así como grupos activados, tales como *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (por ejemplo, ésteres de NHS), sulfo-*N*-hidroxisuccinimida, anhídrido, haluro de acilo ($-\text{C}(=\text{O})$ -halógeno), etc.

En algunas realizaciones, el grupo reactivo comprende un grupo saliente, tal como un grupo saliente susceptible a la sustitución nucleófila (por ejemplo, halo, sulfato, fosfato, carboxilato, *N*-hidroxisuccinimida).

Opcionalmente, el grupo reactivo puede estar en una forma activada del mismo.

Como se usa en el presente documento, la frase "forma activada" describe un derivado de un grupo químico (por ejemplo, un grupo reactivo) que es más reactivo que el grupo químico y que, por lo tanto, es capaz de someterse a una reacción química que conduzca a la formación de un enlace. La forma activada puede comprender un grupo saliente particularmente adecuado, facilitando de este modo las reacciones de sustitución. Por ejemplo, un grupo $-\text{C}(=\text{O})\text{-NHS}$ (éster de *N*-hidroxisuccinimida o $-\text{C}(=\text{O})\text{-O-succinimida}$) es una forma activada bien conocida de $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, ya que la NHS (*N*-hidroxisuccinimida) puede reaccionar con un $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ para formar $-\text{C}(=\text{O})\text{-NHS}$, que reacciona fácilmente para formar productos característicos de reacciones que implican grupos $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, tales como amidas y ésteres.

El grupo reactivo puede unirse al resto del radical de unión (por ejemplo, un poli(alquilenglicol) o análogo del mismo) a través de grupos, átomos o enlaces diferentes. Estos pueden incluir un enlace éter [por ejemplo, $-\text{O}$ -alquilo], un enlace éster [por ejemplo, $-\text{OC}(=\text{O})$ -alquilo], un carbamato [por ejemplo $\text{OC}(=\text{O})\text{-NH}$ -alquilo], etc. Por lo tanto, pueden emplearse una variedad de grupos terminales.

Los siguientes son ejemplos no limitantes de los diferentes grupos que pueden constituir un grupo reactivo como se describe en el presente documento: $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$, $-\text{CH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-NHS}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-NHS}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{-CH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-NHS}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-maleimida}$, etc.

El número de grupos metileno en cada uno de los grupos reactivos anteriores es meramente ejemplar, y puede variarse.

El grupo reactivo también puede comprender el heteroátomo en el extremo de una cadena de poli(alquilenglicol) (por ejemplo, $-\text{OH}$).

En realizaciones ejemplares de la presente invención, el grupo reactivo comprende un carboxilato (por ejemplo, un carboxilato activado tal como un éster de *N*-hidroxisuccinimida).

Opcionalmente, el grupo reactivo reacciona con un grupo amina en la α -galactosidasa (por ejemplo, en un resto de lisina y/o un extremo N) para formar un enlace amida.

- En algunas realizaciones, la reacción del grupo reactivo comprende aminación reductora, en la que un grupo amino reacciona con un grupo aldehído para formar una imina y la imina se reduce (por ejemplo, por la adición de un agente reductor, tal como cianoborohidruro de sodio) para formar un enlace amina. El grupo reactivo puede ser un grupo amina que reacciona con un grupo aldehído de la α -galactosidasa (por ejemplo, en un radical de sacárido unido al polipéptido de la proteína) o el grupo reactivo puede ser un grupo aldehído que reacciona con un grupo amina de la α -galactosidasa (por ejemplo, en un resto de lisina). Opcionalmente, un radical de sacárido de α -galactosidasa se oxida con un agente oxidante para formar un grupo aldehído, antes de la reacción del grupo reactivo con la α -galactosidasa. Por ejemplo, puede usarse la reacción de un sacárido con peryodato de sodio para producir un par de grupos aldehído en un radical de sacárido.
- En algunas realizaciones, al menos uno de los grupos reactivos se selecciona para que reaccione con una funcionalidad de un monómero de α -galactosidasa (por ejemplo, un grupo amino de un resto de lisina o extremo N) y al menos uno de los grupos reactivos se selecciona para que reaccione con una funcionalidad diferente de un monómero de α -galactosidasa (por ejemplo, un grupo tiol de un resto de cisteína).
- Opcionalmente, uno o más polipéptidos descritos en el presente documento se hacen reaccionar con un reactivo de glucosilación para la introducción de uno o más radicales de M6P, para obtener una estructura de proteína multimérica que contenga M6P (por ejemplo, como se describe en el presente documento). Se describen reactivos de glucosilación que contienen M6P adecuados y su uso, por ejemplo, en el documento WO 2009/024977.
- Como se usan en el presente documento, los términos "amina" y "amino" se refieren a un grupo $-NR'R''$, en el que R' y R'' se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalíclico (unido a través de un anillo de carbono), arilo y heteroarilo (unido a través de un anillo de carbono). R' y R'' están unidos a través de un átomo de carbono de los mismos. Opcionalmente, R' y R'' se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo que comprende de 1 a 4 átomos de carbono. Opcionalmente, R' y R'' son hidrógeno.
- Como se usa a lo largo del presente documento, el término "alquilo" se refiere a un hidrato de carbono alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y ramificada. Preferentemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono. Cuando en el presente documento se indica un intervalo numérico; por ejemplo, "1-20", esto implica que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo es un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Más preferentemente, a menos que se indique otra cosa, el alquilo es un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilo puede estar sustituido o no. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, cicloalquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, arilo, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioarilo, sulfino, sulfonilo, ciano, nitro, azida, fosfino, fosfinito, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxilo, O-carboxilo, sulfonamido y amino, de la manera en que estos términos se definen en el presente documento.
- Un grupo "cicloalquilo" se refiere a un anillo compuesto totalmente de carbono, monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono), en el que uno o más de los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Son ejemplos, sin limitación, de grupos cicloalquilo ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, cicloheptatrieno y adamantano. Un grupo cicloalquilo puede estar sustituido o no. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, arilo, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioarilo, sulfino, sulfonilo, ciano, nitro, azida, fosfino, fosfinito, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxilo, O-carboxilo, sulfonamido y amino, de la manera en que estos términos se definen en el presente documento.
- Un grupo "alqueno" se refiere a un grupo alquilo que consta de al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.
- Un grupo "alquino" se refiere a un grupo alquilo que consta de al menos dos átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono.
- Un grupo "arilo" se refiere a grupos compuestos totalmente de carbono, monocíclicos o policíclicos de anillo condensado (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Son ejemplos, sin limitación, de grupos arilo fenilo, naftaleno y antraceno. El grupo arilo puede estar o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, arilo, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioarilo, sulfino, sulfonilo, ciano, nitro, azida, fosfino, fosfinito, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxilo, O-carboxilo, sulfonamido y amino, como se definen estos términos en el presente documento.
- Un grupo "heteroarilo" se refiere a un anillo monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par de átomos adyacentes) que tiene en el anillo o los anillos uno o más átomos, tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Como ejemplos, sin

limitación, de grupos heteroarilo se incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, sulfinilo, sulfonilo, ciano, nitro, azida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, sulfonamido y amino, como estos términos se definen en el presente documento.

Un grupo "heteroalíclico" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado que tiene en el anillo o los anillos uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos también pueden tener uno o más dobles enlaces. Sin embargo, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. El heteroalíclico puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo sustituido puede ser, por ejemplo, un par de electrones, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, halo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, tiohidroxilo, tioalcoxi, tioariloxi, sulfinilo, sulfonilo, ciano, nitro, azida, fosfonilo, fosfinilo, oxo, carbonilo, tiocarbonilo, urea, tiourea, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, sulfonamido y amino, como estos términos se definen en el presente documento. Son ejemplos representativos piperidina, piperazina, tetrahydrofurano, tetrahidropirano, morfolina y similares.

Un grupo "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

Un grupo "azida" se refiere a un grupo $-N=N^+=N^-$.

Un grupo "alcoxi" se refiere tanto a un -O-alquilo como a un grupo -O-cicloalquilo, como se define en el presente documento.

Un grupo "ariloxi" se refiere tanto a un -O-arilo como a un grupo -O-heteroarilo, como se define en el presente documento.

Un "éter" se refiere tanto a un alcoxi como a un grupo un ariloxi, en el que el grupo está unido a un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heteroalíclico.

Un enlace éter describe un enlace -O-.

Un grupo "tiohidroxilo" o "tiol" se refiere a un grupo -SH.

Un grupo "tioalcoxi" se refiere tanto a un grupo -S-alquilo como a un grupo -S-cicloalquilo, como se define en el presente documento.

Un grupo "tioariloxi" se refiere tanto a un grupo -S-arilo como a un grupo -S-heteroarilo, como se define en el presente documento.

Un "tioéter" se refiere tanto a un grupo tioalcoxi como a un grupo tioariloxi, en el que el grupo está unido a un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heteroalíclico.

Un enlace tioéter describe un enlace -S-.

Un grupo "disulfuro" se refiere tanto a un grupo -S-tioalcoxi como a un grupo -S-tioariloxi.

Un enlace disulfuro describe un enlace -S-S-.

Un grupo "carbonilo" se refiere a un grupo $-C(=O)-R'$, en el que R' es como se define en el presente documento anteriormente.

Un grupo "tiocarbonilo" se refiere a un grupo $-C(=S)-R'$, en el que R' es como se define en el presente documento.

Un "carboxilo" se refiere tanto a un "C-carboxi" como a un "O-carboxi".

Un grupo "C-carboxi" se refiere a grupos $-C(=O)-O-R'$, donde R' es como se define en el presente documento.

Un grupo "O-carboxi" se refiere a un grupo $R'C(=O)-O-$, donde R' es como se define en el presente documento.

Un grupo "oxo" se refiere a un grupo =O.

Un "carboxilato" o "carboxilo" incluye grupos tanto C-carboxi como O-carboxi, como se definen en el presente documento.

Un grupo "ácido carboxílico" se refiere a un grupo C-carboxi en el que R' es hidrógeno.

- Un grupo "tiocarboxi" o "tiocarboxilato" se refiere a grupos tanto $-C(=S)-O-R'$ como $-O-C(=S)R'$.
- 5 Un "éster" se refiere a un grupo C-carboxi en el que R' no es hidrógeno.
- Un enlace éster se refiere a un enlace $-O-C(=O)-$.
- Un enlace tioéster se refiere a un enlace $-O-C(=S)-$ o a un enlace $-S-C(=O)-$.
- 10 Un grupo "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.
- Un grupo "sulfinilo" se refiere a un grupo $-S(=O)-R'$, en el que R' es como se define en el presente documento.
- Un grupo "sulfonilo" se refiere a un grupo $-S(=O)_2-R'$, en el que R' es como se define en el presente documento.
- 15 Un grupo "sulfonato" se refiere a un grupo $-S(=O)_2-O-R'$, en el que R' es como se define en el presente documento.
- Un grupo "sulfato" se refiere a un grupo $-O-S(=O)_2-O-R'$, en el que R' es como se define en el presente documento.
- 20 Un grupo "sulfonamida" o "sulfonamido" incluye grupos tanto S-sulfonamido como N-sulfonamido, como se define en el presente documento.
- Un grupo "S-sulfonamido" se refiere a un grupo $-S(=O)_2-NR'R''$, en el que R' y R'' son como se definen en el presente documento.
- 25 Un grupo "N-sulfonamido" se refiere a un grupo $R'S(=O)_2-NR''$, en el que cada R' y R'' es como se define en el presente documento.
- Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo $-OC(=O)-NR'R''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento.
- 30 Un grupo "N-carbamilo" se refiere a un grupo $R'OC(=O)-NR''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento.
- 35 Un grupo "carbamilo" o "carbamato" incluye grupos tanto O-carbamilo como N-carbamilo.
- Un enlace carbamato describe un enlace $-O-C(=O)-NR''$, en el que R es como se describe en el presente documento.
- 40 Un grupo "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $-OC(=S)-NR'R''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento.
- Un grupo "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo $R'OC(=S)NR''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento.
- 45 Un grupo "tiocarbamilo" o "tiocarbamato" incluye grupos tanto O-tiocarbamilo como N-tiocarbamilo.
- Un enlace tiocarbamato describe un enlace $-O-C(=S)-NR''$, en el que R' es como se describe en el presente documento.
- 50 Un grupo "C-amido" se refiere a un grupo $-C(=O)-NRR''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento.
- Un grupo "N-amido" se refiere a un grupo $R'C(=O)-NR''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento.
- 55 Un grupo "amida" incluye grupos tanto C-amido como N-amido.
- Un enlace amida describe un enlace $-NR''-C(=O)-$, en el que R' como se define en el presente documento.
- 60 Un enlace amina describe un enlace entre un átomo de nitrógeno en un grupo amina (como se define en el presente documento) y un grupo R' en el grupo amina.
- Un enlace tioamida describe un enlace $-NR''-C(=S)-$, en el que R' es como se define en el presente documento.
- 65

Un grupo "urea" se refiere a un grupo $-N(R')-C(=O)-NR''$, en el que cada uno de R' y R'' es como se define en el presente documento y R''' se define como R' y R'' como se definen en el presente documento.

Un grupo "nitro" se refiere a un grupo $-NO_2$.

Un grupo "ciano" se refiere a un grupo $-C\equiv N$.

El término "fosfonilo" o "fosfonato" describe un grupo $-P(=O)(OR')(OR'')$, siendo R' y R'' como se definen anteriormente en el presente documento.

El término "fosfato" describe un grupo $-O-P(=O)(OR')(OR'')$, siendo cada uno de R' y R'' como se definen en el presente documento anteriormente.

Un "ácido fosfórico" es un grupo fosfato en el que cada uno de R es hidrógeno.

El término "fosfinilo" describe un grupo $-PR'R''$, siendo cada uno de R' y R'' como se definen anteriormente en el presente documento.

El término "tiourea" describe un grupo $-N(R')-C(=S)-NR''$, siendo cada uno de R' y R'' como se definen anteriormente en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, las estructuras de proteína multimérica descritas en el presente documento pueden exhibir una estabilidad mejorada y una actividad α -galactosidasa más fuerte y/o más duradera en sitios terapéuticamente importantes *in vivo*. Dichas estructuras de proteína multimérica son, por lo tanto, muy beneficiosas para su uso en diversas aplicaciones médicas en las que es deseable la actividad α -galactosidasa, incluyendo aplicaciones terapéuticas y de investigación.

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones, la estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento es para su uso como un medicamento, por ejemplo, un medicamento para tratar la enfermedad de Fabry.

De acuerdo con otro aspecto de realizaciones de la invención, se proporciona un método de tratamiento de la enfermedad de Fabry, comprendiendo el método la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de una estructura de proteína multimérica descrita en el presente documento.

De acuerdo con otro aspecto de las realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una estructura de proteína multimérica como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a la preparación de una o más de las estructuras de proteína multimérica descritas en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables y adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En lo sucesivo en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o a un diluyente que no ocasiona irritación significativa en un organismo y no anula la actividad y propiedades biológicas del compuesto administrado. Son ejemplos, sin limitaciones, de vehículos: propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua, así como vehículos sólidos (por ejemplo, en polvo) y gaseosos.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Como ejemplos, sin limitación, de excipientes se incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

La composición farmacéutica comprende opcionalmente un ingrediente adicional que también estabiliza la α -galactosidasa de la estructura de proteína multimérica. Opcionalmente, el ingrediente adicional es galactosa.

Como alternativa, puede usarse un derivado de galactosa (por ejemplo, un glucósido que contenga galactosa) en lugar de galactosa. Opcionalmente, se usa un derivado de galactosa no reductor.

Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

5 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden, por lo tanto, formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de la estructura de proteína multimérica en las preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración que se seleccione.

10 Para la inyección o infusión, las estructuras de proteína multimérica de las realizaciones de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol o polietilenglicol.

15 Para la administración transmucosa, se usan penetrantes en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

20 Para la administración oral, las estructuras de proteína multimérica de la invención pueden formularse combinando fácilmente las estructuras de proteína multimérica con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que las estructuras de proteína multimérica descritas en el presente documento se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares para la ingestión oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, triturando opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de
25 gránulos, y después añadiendo auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Como excipientes adecuados se incluyen, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden
30 añadirse agentes disgregantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

35 Los núcleos de las grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para esta finalidad, pueden usarse soluciones de azúcar concentrado que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los recubrimientos de los comprimidos o grageas para ayudar a la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de la estructura de proteína multimérica activa.

40 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, las estructuras de proteína multimérica pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados,
45 tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración seleccionada.

50 Para la administración bucal, las composiciones pueden estar en formas de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de una manera convencional.

Para la administración por inhalación, las estructuras de proteína multimérica para su uso de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol (que típicamente incluye vehículos en polvo, licuados y/o gaseosos) a partir de un envase
55 presurizado o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla en polvo de las estructuras de proteína multimérica y una base en polvo adecuada tal como, pero sin limitación, lactosa o almidón.

60 Las estructuras de proteína multimérica descritas en el presente documento pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección o infusión pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis,
65 opcionalmente, con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones

en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

5 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación de estructura de proteína multimérica en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de las estructuras de proteína multimérica pueden prepararse como suspensiones y emulsiones de inyección oleaginosas apropiadas (por ejemplo, emulsiones de agua en aceite, aceite en agua o agua en aceite en aceite). Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen ácidos grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de las estructuras de proteína multimérica para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

15 Como alternativa, las estructuras de proteína multimérica pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril apirógena, antes de su uso.

20 La estructura de proteína multimérica de las realizaciones de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

25 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden comprender excipientes o vehículos sólidos adecuados de fase gel. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las cuales los ingredientes activos están incluidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito que se pretende. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de estructuras de proteína multimérica eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se esté tratando.

35 Para cualquiera de las estructuras de proteína multimérica usadas en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de actividad en animales. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluya la CI_{50} determinada por ensayos de actividad (por ejemplo, la concentración de las estructuras de proteína de ensayo que consigue un aumento semi-máximo en una actividad biológica de la estructura de la proteína multimérica). Dicha información puede usarse para determinar de un modo más preciso las dosis útiles en seres humanos.

40 Como se demuestra en la sección de Ejemplos que se proporciona a continuación, una cantidad terapéuticamente eficaz para las estructuras de proteína multimérica de las realizaciones de la presente invención puede variar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal y aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal.

45 La toxicidad y eficacia terapéutica de las estructuras de proteína multimérica descritas en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales experimentales, por ejemplo, determinando la CE_{50} , la CI_{50} y la DL_{50} (dosis letal que causa la muerte en el 50 % de los animales ensayados) para una estructura de proteína dada. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de actividad y estudios en animales pueden usarse en la formulación de una serie de dosificaciones para uso en seres humanos.

50 La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración que se utilice. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden seleccionarse por el médico individual en vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1p.1).

55 La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma del radical activo que son suficientes para mantener los efectos deseados, denominados concentración mínima eficaz (CME). La CME variará en cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*, por ejemplo, la concentración necesaria para conseguir el nivel de actividad deseado *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CME dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos de HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas.

65 También pueden determinarse intervalos de dosificación usando el valor de CME. Las preparaciones deben administrarse usando un régimen que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la CME durante el 10-90 % del tiempo, preferentemente entre el 30-90 % y más preferentemente entre el 50-90 %.

Dependiendo de la gravedad y de la respuesta de la afección que vaya a tratarse, la dosificación también puede ser una sola administración de una composición de liberación lenta descrita en el presente documento anteriormente, con un ciclo de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la cura o se consiga la disminución de la patología.

5 La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que vaya a tratarse, de la gravedad de la dolencia, de la forma de administración, del criterio del médico a cargo del tratamiento, etc.

10 Las composiciones de la presente invención pueden estar presentes, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA (la administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos), que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como, pero sin limitación, un blíster o un envase presurizado (para inhalación). El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado en el recipiente en una forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, uso y venta de agentes farmacéuticos, reflejando dicho aviso la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser una etiqueta aprobada por la administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos para fármacos de prescripción o un prospecto aprobado. También pueden prepararse composiciones que comprenden una estructura de proteína multimérica de realizaciones de la invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible, colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección o diagnóstico indicado, como se detalla en el presente documento.

25 Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención, dependiendo de las estructuras de proteína multimérica seleccionadas, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se envasa en un material de envasado y se identifica en forma impresa en o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento de una afección en la que es beneficiosa la actividad de la estructura de la proteína multimérica, como se describe anteriormente en el presente documento.

30 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye, pero sin limitación".

35 La expresión "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

La palabra "ejemplar" se usa en el presente documento para indicar "que sirve como un ejemplo, caso o ilustración". Cualquier realización descrita como "ejemplar" no debe considerarse necesariamente preferida o ventajosa sobre otras realizaciones y/o excluir la incorporación de características de otras realizaciones.

40 La palabra "opcionalmente" se usa en el presente documento para indicar "se proporciona en algunas realizaciones y no se proporciona en otras realizaciones. Cualquier realización particular de la invención puede incluir una pluralidad de características "opcionales" a menos que esto represente un conflicto.

45 Como se usa en el presente documento, la forma singular "uno", "una", "un" y "el", "la" incluyen referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo sus mezclas.

50 A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de la presente invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad y no debe considerarse una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo desvela específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos desvelados específicamente tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

60 Cuando se indica un intervalo numérico en el presente documento, este pretende incluir cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan indistintamente en el presente documento y significa que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales e integrales entre los mismos.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada incluyendo, pero sin limitación, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicos y

procedimientos conocidos por los expertos en las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

5 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

10 Se aprecia que determinadas características de la invención, que por claridad se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de estas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin estos elementos.

15 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se indican en el presente documento anteriormente y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

20 Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

25 *Materiales y métodos*

Materiales:

30 Se obtuvo bis-*N*-hidroxisuccinimida-poli(etilenglicol) (bis-NHS-PEG) en Iris Biotech GmbH en formas PEG₈ y PEG de 2000 Dalton (PEG₄₅) y en Pierce en forma PEG₅, y se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 25 mg/ml;
 El ácido cítrico se obtuvo en Sigma;
 El Azul de Coomassie G250 se obtuvo en Bio-Rad;
 El dimetilsulfóxido se obtuvo en Sigma;
 35 La D-(+)-galactosa se obtuvo en Sigma;
 El plasma humano (K3 EDTA) se obtuvo en Bioreclamation Inc.;
 La 4-metilumbeliferona se obtuvo en Sigma;
 La 4-metilbeliferil- α -D-galactopiranosido se obtuvo en Sigma;
 N-dodecanoil-nitrobenzoxadiazol-ceramida trihexósido (Gb₃-NBD) se obtuvo en Matreya;
 40 El ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico se obtuvo en Merck;
 La solución salina tamponada con fosfato se obtuvo en Sigma;
 El *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido se obtuvo en Sigma;
 La primulina se obtuvo en Sigma; el reactivo de pulverizado de primulina se preparó disolviendo 12,5 mg de primulina en 200 ml de acetona:agua (relación de volumen 8:2);
 45 La piridina se obtuvo en Sigma;
 El ácido sinapínico se obtuvo en Sigma;
 El carbonato de sodio se obtuvo en Sigma;
 El fosfato de sodio se obtuvo en Sigma;
 El taurocolato de sodio se obtuvo en Sigma;
 50 El ácido trifluoroacético se obtuvo en Sigma.

α -GAL-I humana recombinante vegetal:

55 La α -GAL humana recombinante vegetal (prh- α -GAL) que tiene la SEQ ID NO: 1, se refiere en el presente documento a la α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-I), se preparó como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/IL2008/000576 (publicada como documento WO 2008/132743).

60 El material vegetal transgénico se generó usando plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltrada con la construcción genética que contenía el casete de expresión para α -GAL-A, para expresar la proteína α -GAL-A humana. Esto se realizó en una cámara de cultivo en condiciones controladas. Después de esto, se recogió el material vegetal y se realizó la extracción de proteínas solubles de las células vegetales. Después, la prh- α -GAL-A se purificó mediante un proceso de purificación que implicaba métodos convencionales para la purificación de proteínas seguido de una etapa de modificación química para fabricar la proteína reticulada. La presente prh- α -GAL-A se extrajo de material vegetal usando homogeneizadores. Los desechos vegetales se retiraron por centrifugación y la proteína se purificó
 65 adicionalmente usando etapas de precipitación con sulfato de amonio y de acidificación. El sobrenadante se filtró y

se cargó en una columna hidrófoba, seguido de desalinización y carga en una columna de intercambio catiónico. El conjunto de la columna de intercambio catiónico se concentró.

α-GAL-II humana recombinante vegetal:

La α-GAL humana recombinante vegetal que comprende una mezcla de α-GAL que tiene la SEQ ID NO: 2 y α-GAL que tiene la SEQ ID NO: 3 (sin los aminoácidos EF N-terminales presentes en la SEQ ID NO: 1), denominada en el presente documento prh-α-GAL-II, se preparó mediante un proceso similar al descrito anteriormente para prh-α-GAL-I, usando una construcción genética diferente.

El ADNc que codifica la proteína α-galactosidasa humana (EC 3.2.1-22 GenBank: X05790) se optimizó y se sintetizó en GENEART AG (Regensburg, Alemania). El uso de codones sin el péptido líder (péptido señal que se dirige al retículo endoplasmático) se adaptó al sesgo de codones de los genes de *Nicotiana tabaccum*. Durante el proceso de optimización se evitaron los siguientes motivos de secuencia que actúan en cis: cajas internas TATA, sitios chi y sitios de entrada al ribosoma, tramos de secuencias ricos en AT o ricos en GC, elementos de inestabilidad de ARN ("motivos *killer*"), secuencias de repetición y estructuras secundarias de ARN, sitios donantes (crípticos) y aceptores de corte y empalme y puntos de ramificación. Además, se evitaron regiones de muy alto (> 80 %) o muy bajo (<30 %) contenido de GC.

La secuencia de nucleótidos del péptido líder de α-galactosidasa humana nativa (péptido señal que se dirige al retículo endoplasmático) de la proteína α-galactosidasa humana de longitud completa (GenBank: X05790) se reemplazó por una secuencia de nucleótidos que codificaba el péptido señal que se dirige al retículo endoplasmático (péptido líder) de 33 aminoácidos de la proteína ABPI de *Arabidopsis*. Este péptido señal proporciona un direccionamiento eficaz de la α-galactosidasa a la ruta secretora y se escinde del polipéptido por la peptidasa señal, una vez que la proteína se ha translocado al interior del retículo endoplasmático. Se añadió una secuencia de nucleótidos que codifica la señal de retención del retículo endoplasmático SEKDEL a la secuencia de ADNc en el extremo 3', lo que permitió la recuperación de la proteína expresada del aparato de Golgi, manteniendo de un modo eficaz la proteína en el retículo endoplasmático.

La proteína de interés se expresó a partir de un promotor de virus subgenómico fuerte de la proteína de recubrimiento. El sistema se basa en la amplificación transitoria (por agroinfección) de vectores de virus suministrados a una planta por *Agrobacterium*. En la agroinfección, un promotor funcional de planta y el ADNc que codifica un replicón de virus se transfieren como ADN-T desde *Agrobacterium* al interior de células vegetales. El ADN-T se transcribe en la planta por el promotor de plantas para generar ARN de virus biológicamente activo que inicia la autorreplicación.

Para la expresión transitoria se usó un sistema de recombinación de 3 vectores basado en el sistema previamente desarrollado como se describe [Gleba *et al.*, Vaccine 2005, 23: 2042-2048]. En uno de los vectores se insertó ADNc de α-galactosidasa y los otros dos vectores contenían los genes para la construcción de todo el replicón de virus (RdRp e Integrasa), generándose de esta manera el ARN vírico biológicamente activo que puede iniciar la autorreplicación.

Las plantas de *N. benthamiana* se dejaron germinar y se cultivaron en un sustrato mixto comercial (Givaat Ada, IL) complementado con fertilizante de liberación lenta granular (Scott Marysville, OH) en un régimen de luz de un día de duración (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a 24-25 °C.

Las agrobacterias se transformaron con el sistema del vector replicón basado en pICH20866-alfa-GAL usando electroporación (2500 V, 5 milisegundos) [den Dulk-Ra y Hooykaas, Methods Mol Biol 1995, 55: 63-72]. Las plantas se infiltraron con Agrobacterias que contenían los 3 plásmidos ICON por infiltración al vacío con métodos convencionales conocidos en la técnica. En resumen, plantas de *N. benthamiana*, de 5-6 semanas de edad, se infiltraron sumergiendo todos los órganos aéreos de la planta en una suspensión bacteriana y se colocaron en una cámara de vacío. Se aplicó un vacío de menos (-) 0,8 bares durante 1 minuto, seguido de un rápido retorno a presión atmosférica. Las plantas volvieron a llevarse al invernadero durante 5-7 días más en las mismas condiciones de cultivo.

Se recogieron muestras de hojas de *Nicotiana benthamiana* 5 días después de la infiltración y se extrajeron en tampón de Laemmli para SDS-PAGE, o en tampón de ensayo de actividad (ácido cítrico 20 mM, fosfato de sodio 30 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 % y etanol al 0,67 %, pH 4,6) para ensayar la actividad catalítica de la proteína expresada en la planta.

La proteína α-galactosidasa humana de extractos vegetales se purificó mediante una precipitación diferencial de sulfato de amonio de dos etapas ("precipitación con sal" ("*salting out*"): 1ª etapa 0,57 M, 2ª etapa 2,27 M), seguido por cromatografía de interacción hidrófoba (resina Phenil 650 M) y cromatografía de intercambio catiónico.

Se obtuvieron dos secuencias (es decir, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3), que diferían en la presencia o ausencia de una glicina N terminal, debido a un procesamiento diferente de la secuencia líder.

Ensayo con 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido de actividad α -GAL:

5 La actividad α -GAL se midió usando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido como sustrato de hidrólisis. El ensayo se realizó en tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 20 mM, fosfato de sodio 30 mM, pH 4,6). Se incubaron 10 μ l de una muestra que contenía la α -GAL ensayada con 40 μ l de tampón de ensayo que contenía 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido 5 mM. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Se transfirieron 10 μ l de la mezcla de reacción a una placa negra de 96 pocillos (Greiner), se añadieron 90 μ l de solución de detención (carbonato de sodio 2 M) y se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. La fluorescencia se tradujo a concentración de producto, y adicionalmente a actividad, usando una curva de calibrado de 4-metilumbeliferona, el producto de reacción.

Ensayo con trihexósido de N-dodecanoil-nitrobenzoxadiazol-ceramida (Gb₃-NBD) de actividad α -GAL

15 El sustrato marcado con fluorescencia trihexósido de N-dodecanoil-nitrobenzoxadiazol-ceramida (Gb₃-NBD) es menos lipófilo que Gb₃, lo que facilita su uso en reacciones enzimáticas *in vitro*.

20 Se añadieron 10 μ l de Gb₃-NBD 0,1 μ g/ μ l (en agua con etanol al 10 %) y 5 μ l de α -GAL 0,2 mg/ml se añadieron a 85 μ l de tampón citrato-fosfato a un pH de 4,6. La concentración final de α -GAL fue de 10 μ g/ml. La reacción de fondo o no catalizada, sin α -GAL, se componía de 90 μ l de tampón citrato-fosfato a un pH de 4,6 con 10 μ l de Gb₃-NBD 0,1 μ g/ μ l (en agua con etanol al 10 %). Las mezclas de reacción se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 50 μ l de metanol a la mezcla de reacción y las soluciones se agitaron vorticialmente durante 1 minuto. Después se añadieron 100 μ l de cloroformo y las soluciones volvieron a agitarse vorticialmente durante 1 minuto. El agua y los disolventes orgánicos se retiraron al vacío usando un sistema Speed Vac. Los residuos se disolvieron en 80 μ l de cloroformo:metanol (1:1). Se cargaron 30 μ l de cada muestra en 60 placas de Gel de Sílice HPTLC (cromatografía de capa fina de alto rendimiento) (Merck) usando un sistema Linomat V (CAMAG). Las placas de HPTLC se revelaron usando una solución de cloroformo:metanol:H₂O a una relación de 100:42:6 como un sistema disolvente. Después, las placas se dejaron secar y el sustrato y las manchas de producto se visualizaron por irradiación con luz UV a una longitud de onda de 365 nm.

30 *Ensayo con p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (p-NP-G) de actividad α -GAL:*

35 Se usó p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido como un sustrato de hidrólisis para ensayos de actividad α -GAL. El tampón de ensayo contenía ácido cítrico 20 mM, fosfato de sodio 30 mM, BSA (albúmina de suero bovino) al 0,1 % y etanol al 0,67 % a pH 4,6. El ensayo se realizó en placas ELISA de 96 pocillos (Greiner). Se incubaron 50 μ l de muestra con 150 μ l de tampón de ensayo y se añadieron 30 μ l de sustrato para obtener una concentración final de p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido 8 mM. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Después de 90 minutos, se añadieron 100 μ l de carbonato de sodio 1,98 M a cada pocillo para finalizar la reacción. La cantidad de producto de reacción se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm.

40 *Medición de la estabilidad de α -GAL in vitro:*

La estabilidad de α -GAL de diversas fuentes se determinó añadiendo α -GAL a una de las siguientes condiciones:

- 45
- 1) condiciones lisosómicas simuladas: tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 20 mM, fosfato de sodio 30 mM), pH 4,6, 37 °C;
 - 2) condiciones fisiológicas simuladas: solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, 37 °C;
 - 3) plasma humano a 37 °C.

50 Se añadió α -GAL a una concentración de 1 μ g/ml, según se determina por la actividad de α -GAL en la solución, y la solución se incubó a 37 °C. Se extrajeron muestras de cada solución a puntos de tiempo predeterminados y la actividad α -GAL se midió como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El valor de la actividad enzimática inmediatamente después de la adición de α -GAL ensayada a cada entorno se definió como 100 %, y los resultados de actividad adicionales en los puntos de tiempo ensayados se calcularon como porcentaje de esa actividad inicial.

55 *Farmacocinética de α -GAL:*

60 Se colocaron ratones con enfermedad de Fabry individuales (α -Gal-A-/0) en un dispositivo de retención de plexiglás iluminado y se inyectó la enzima en la vena de la cola. Se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos indicados después de la inyección mediante sangrado de la cola o sangrado ocular retroorbital, usando tubos de microhematocrito heparinizados. El plasma se diluyó en tampón de actividad 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido. Se realizó un ensayo de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido como se ha descrito anteriormente.

65

Se calculó la semivida de eliminación terminal ($T_{1/2}$) en función de los resultados de la actividad en plasma. La semivida terminal (semivida de eliminación) es el tiempo necesario para que la concentración de plasma disminuya en un 50 % después de haber alcanzado el pseudo-equilibrio de distribución. La semivida terminal se calculó a partir de la porción terminal (logaritmo lineal) de la curva, mediante regresión lineal del tiempo frente a la concentración log [Toutain y Bousquet-Melou, J Vet Pharmacol Ther 2004, 27: 427-39].

Biodistribución de α -GAL:

Ratones con la enfermedad de Fabry (α -Gal-A-0) recibieron una inyección intravenosa (en la vena de la cola) de α -GAL a una dosis de 2 mg/kg. Se recogieron los tejidos (hígados, riñones, corazones y bazos) 2 horas, 24 horas, 3 días, 7 días, 14 días o 28 días después de la inyección de la enzima. Los niveles de α -GAL en ratones de control normales y en ratones con enfermedad de Fabry a los que se administró solución salina (no tratados) se compararon con los niveles en ratones con enfermedad de Fabry que recibieron α -GAL exógena. Para determinar la actividad α -GAL en tejidos, se colocaron muestras de tejido descongelado en tubos de polipropileno de 2 ml que contenían tampón de lisis (ácido cítrico 28 mM, fosfato sódico dibásico 44 mM, taurocolato de sodio 0,5 %, pH 4,4) como se describe en Oshima *et al.* [PNAS 1997, 94: 2540-2544]. Las muestras se homogeneizaron usando un Tissuelyzer (Retsch MM400) durante 10 minutos. Los residuos se sedimentaron por centrifugación a 4 °C y los sobrenadantes resultantes se sometieron a ensayo con respecto a la actividad de α -GAL mediante un ensayo con 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido, como se ha descrito anteriormente. Estas mismas muestras también se sometieron a análisis de transferencia de Western.

Ensayo in vivo con Gb₃:

El criterio de valoración de eficacia de la α -GAL inyectada se midió por ensayo de los niveles de Gb₃ de los tejidos animales, para determinar si los niveles de Gb₃ habían disminuido por la actividad α -GAL.

Para medir la hidrólisis de Gb₃, se extrajeron glicoesfingolípidos neutros de órganos diana (por ejemplo, hígado, riñón, corazón y bazo). Se homogeneizaron muestras de tejido de 100 mg en 1 ml de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se centrifugaron durante 20 minutos a 13.500 rpm. Se añadieron 62 μ l de agua a un homogeneizado de 1 ml para dar una solución de cloroformo:metanol:agua de 20:10:2. Se añadieron 10 μ l de piridina al homogeneizado para dar una concentración final de piridina de 1 %. La muestra se agitó durante 24 horas a 48 °C. Los disolventes y el agua se retiraron al vacío usando un sistema SpeedVac. La muestra se resuspendió en 2,5 ml de metanol y después se añadieron 250 μ l de KOH 1 M en metanol. Después, la mezcla se agitó durante 2 horas a 37 °C. La reacción de saponificación se detuvo por la adición de 10 μ l de ácido acético. Después se añadieron 2,5 ml de cloroformo a la muestra, seguido por la adición de 2,5 ml de agua fría. La muestra se agitó intensamente durante 5 minutos y se dejó reposar durante 5 minutos para permitir la separación de fases. La fase superior, compuesta de metanol y agua, se descartó, y la fase inferior, compuesta de cloroformo y metanol, se evaporó al vacío (SpeedVac), y el residuo se resuspendió en 300 μ l de cloroformo:metanol 1:1 (v/v) para el análisis de los glucoesfingolípidos por HPTLC.

Se realizaron análisis cualitativos y semicuantitativos de glucolípidos tisulares por cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) (CAMAG, Suiza). El análisis de HPTLC se realizó en 60 placas recubiertas de vidrio con gel de sílice HPTLC (Merck). Las muestras se cargaron en las placas usando un sistema Linomat 5 (CAMAG, Suiza). Las placas se revelaron usando cloroformo-metanol-agua (60:35:4) como sistema disolvente. Los glucoesfingolípidos neutros se detectaron con reactivo de pulverización de primulina. Se identificó Gb₃ usando Gb₃ de eritrocito porcino (Matreya) como patrón, y se cuantificó usando una curva de calibración de trihexósido de *N*-heptadecanoil ceramida (Matreya), un patrón semisintético. Las placas se visualizaron y las manchas relevantes se cuantificaron usando un Scanner III TLC (CAMAG, Suiza) soportado por el programa informático winCATS (CAMAG, Suiza).

SDS-PAGE:

Se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras usando un sistema Bio-Rad Criterion™ y gel de acrilamida al 12 % diseñado internamente. El gel se tiñó con tinción Azul de Coomassie G250.

IEF (isoelectroenfoque):

Se realizó IEF usando mini-cell Novex® de Invitrogen y geles IEF previamente diseñados que tenían un intervalo de pH de 3-7 (Invitrogen). El gel se tiñó con Azul de Coomassie G250.

Espectrometría de masas (MALDI-TOF):

Se realizó MALDI-TOF usando un sistema de espectrómetro de masas MALDI-ToF Bruker Reflex IV (Bruker-Franzen Analytik GmbH, Alemania) y una solución matriz saturada con ácido sinapínico/ácido trifluoroacético (TFA) (TFA/acetronitrilo al 0,1 % (2:1, v/v)).

Ejemplo I

Estabilidad in vitro de α -GAL recombinante

5 Se midió la estabilidad *in vitro* de α -GAL recombinante en diversas afecciones como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la Sección de Materiales y Métodos. Se ensayaron la α -GAL-I humana recombinante vegetal, así como la α -GAL humana recombinante comercial Fabrazyme® y Replagal®.

10 Como se muestra en la Figura 1, todos los tipos ensayados de α -GAL exhibieron una pérdida de actividad en condiciones lisosómicas simuladas.

Además, como se muestra en la Figura 2, todos los tipos ensayados de α -GAL exhibieron una pérdida de actividad en condiciones fisiológicas simuladas. Como se muestra en el presente documento adicionalmente, la presencia de galactosa 100 mg/ml protegió parcialmente la actividad de α -GAL-I recombinante vegetal en dichas condiciones.

15 De manera similar, como se muestra en la Figura 3, todos los tipos ensayados de α -GAL exhibieron una pérdida de actividad en plasma humano a 37 °C.

20 Como se muestra en la Figura 4, la presencia de 100 mg/ml de galactosa protegió parcialmente la actividad de α -GAL-I recombinante vegetal en condiciones lisosómicas simuladas.

Los experimentos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) a niveles de pH lisosómicos y neutros demostraron cambios en la estructura de la proteína (datos no mostrados), mientras que análisis SDS-PAGE y transferencia de Western no exhibieron ninguna degradación de la secuencia de aminoácidos primaria (datos no mostrados).

25 Estos resultados indican que α -GAL pierde actividad en condiciones lisosómicas y condiciones fisiológicas debido a la alteración de la estructura de la proteína α -GAL, y que la galactosa impide parcialmente esta pérdida de actividad.

Ejemplo II

30 *Reticulación de α -GAL-I humana recombinante vegetal con agentes de bis-N-hidroxisuccinimida-poli(etilenglicol) (bis-NHS-PEG)*

35 La α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-I) se reticuló a proporciones molares de 50:1, 100:1 y 200:1 con bis-N-hidroxisuccinimida-poli(etilenglicol) (bis-NHS-PEG) de diversos pesos moleculares, concretamente bis-NHS-PEG₅, bis-NHS-PEG₈ o bis-NHS-PEG₄₅ (bis-NHS-PEG con PEG de 2.000 Dalton), cuyas estructuras se muestran en la Figura 5.

40 El bis-NHS-PEG puede unirse a la proteína en dos sitios en una proteína (por ejemplo, restos de lisina), formando de este modo la reticulación, o en un sitio en una proteína. En la Figura 6 se representan estas dos formas de unión.

Se añadieron 100 μ g de α -GAL-I en 28,5 μ l de tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) (25 mM, pH 6) a 13,5 μ l de tampón fosfato (100 mM, pH 8) que contenía galactosa 100 mg/ml.

45 Se reticuló α -GAL-I con bis-NHS-PEG₅ a proporciones molares de reactivo:proteína 1:50, 1:100 y 1:200, añadiendo bis-NHS-PEG₅ en 8 μ l de DMSO a la solución de α -GAL-I (27,4 μ g de solución α -GAL-I para una proporción molar de 1:50, 54,8 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar de 1:100 y 109,7 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar de 1:200).

50 La α -GAL-I se reticuló con bis-NHS-PEG₄₅ a proporciones molares de proteína:reactivo de 1:50, 1:100 y 1:200 añadiendo bis-NHS-PEG₄₅ en 8 μ l de DMSO a la solución de α -GAL-I (103 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar 1:50, 206 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar de 1:100 y 412 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar de 1:200). La α -GAL-I se reticuló con bis-NHS-PEG₈ a proporciones molares de proteína:reactivo de 1:50, 1:100 y 1:200, añadiendo bis-NHS-PEG₈ en 11,5 μ l de DMSO a la solución de α -GAL-I (37 μ g de α -GAL-I para una proporción molar de 1:50, 73 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar de 1:100 y 146 μ g de solución de α -GAL-I para una proporción molar de 1:200).

55 Después de añadir el agente bis-NHS-PEG a la α -GAL-I, las reacciones se pipetearon y agitaron en un agitador orbital durante 2 horas a temperatura ambiente.

60 En todas las reacciones, el exceso de reactivo de reticulación bis-NHS-PEG se retiró por diálisis frente a solución salina (límite de 50 KDa).

65 La producción de dímero aumentó con el aumento de la concentración de proteína y concentración de DMSO, alcanzando hasta un 30 %.

Los productos de reacción se analizaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), IEF (isoelectroenfoque), transferencia de Western y espectrometría de masas MALDI-TOF, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 5 Como se muestra en la Figura 7, se observó la prh- α -GAL-I nativa patrón como un monómero (que tenía un peso molecular de 48 KDa) después de la electroforesis en gel, mientras que después de la reacción de prh- α -GAL-I con bis-NHS-PEG, la prh- α -GAL-I apareció principalmente en forma de un dímero (con algo de monómero presente), indicando que los dos monómeros estaban ligados de manera covalente mediante reticulación con bis-NHS-PEG.
- 10 Como también se muestra en la Figura 7, se observó una mayor proporción de prh- α -GAL-I monomérica con los agentes de reticulación más cortos, bis-NHS-PEG₅ y bis-NHS-PEG₈, que con el agente de reticulación más largo bis-NHS-PEG₄₅. El bis-NHS-PEG₄₅ produjo una proporción más alta de proteína reticulada. Estos resultados indican que los agentes de reticulación más cortos son menos eficaces para unir covalentemente los monómeros.
- 15 Como también se muestra en la Figura 7, para cada uno de los agentes de reticulación ensayados, el peso molecular de la parte monomérica de prh- α -GAL-I aumentó después de la reacción con el agente de reticulación. El aumento en el peso molecular fue mayor cuando se usó una mayor proporción de agente de reticulación con respecto a proteína (por ejemplo, 200:1), y cuando el peso molecular del agente de reticulación fue mayor (por ejemplo, bis-NHS-PEG₄₅). Estos resultados indican que los monómeros de proteína que no dimerizaron por
- 20 reticulación, estaban unidos de manera covalente con el agente de reticulación bis-NHS-PEG, es decir las proteínas estaban PEGiladas.

Los resultados anteriores indican que el uso de un mayor exceso molar de agente de reticulación con respecto a proteína produce niveles más altos de modificación de α -GAL, incluyendo tanto la reticulación para formar un dímero como la PEGilación de las proteínas. Sin embargo, una proporción molar de 100:1 proporcionó un alto nivel de reticulación, especialmente en las reacciones que utilizaban el reactivo bis-NHS-PEG₄₅, de tal manera que una proporción molar de 200:1 proporcionó únicamente una adición marginal a la eficacia del agente de reticulación.

30 Como se muestra en la Figura 8, la reacción de prh- α -GAL-I con bis-NHS-PEG redujo el punto isoelectrónico (pI) de prh- α -GAL-I, confirmando por lo tanto que el bis-NHS-PEG está unido covalentemente a la prh- α -GAL-I. La unión de bis-NHS-PEG con prh- α -GAL-I convierte los grupos amina básicos de restos de lisina en grupos amida neutros, reduciendo de este modo el pI. La reducción del pI era más pronunciada cuando se usaba un exceso molar más alto (por ejemplo, 200:1) de bis-NHS-PEG, confirmando los resultados anteriores obtenidos por SDS-PAGE.

35 Como se muestra adicionalmente en la Figura 8, el pI se redujo más con bis-NHS-PEG₅ y bis-NHS-PEG₈ que con bis-NHS-PEG₄₅.

Este resultado indica que bis-NHS-PEG₅ y bis-NHS-PEG₈ tienen más probabilidad que bis-NHS-PEG₄₅ de producir una PEGilación en la que solo un extremo del agente de reticulación esté unido a α -GAL. Un agente de reticulación unido a α -GAL en un solo extremo es más eficaz para reducir el pI porque dicho agente de reticulación comprende un grupo de ácido carboxílico (-CO₂H) en el extremo no unido, además de convertir un grupo amino de lisina en un grupo amida en el extremo unido.

45 Como se muestra en la Figura 9, la reacción de prh- α -GAL-I con el agente de reticulación bis-NHS-PEG₄₅ aumentó el peso molecular del dímero de prh- α -GAL-I de 97 KDa a 113 KDa, determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF. El aumento en el peso molecular indica una adición de aproximadamente 8 moléculas de bis-NHS-PEG₄₅ en el dímero de prh- α -GAL-I.

50 Como se muestra en la Figura 10, la reacción de prh- α -GAL-I con el agente de reticulación bis-NHS-PEG₈ aumentó el peso molecular del dímero de prh- α -GAL-I de 97 KDa a 104 KDa, determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF. El aumento en el peso molecular indica una adición de aproximadamente 10 moléculas de bis-NHS-PEG₉ en el dímero de prh- α -GAL-I.

Ejemplo III

Actividad de α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada

60 Para determinar si la α -GAL-I recombinante vegetal (prh- α -GAL-I) reticulada descrita en el Ejemplo II conservaba la actividad enzimática, la prh- α -GAL-I reticulada se sometió a ensayo para determinar su actividad enzimática usando el ensayo de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido descrito anteriormente.

65 Como se muestra en la siguiente Tabla 1, prh- α -GAL-I que reaccionó con el reactivo bis-NHS-PEG, bis-NHS-PEG₅, bis-NHS-PEG₈ o bis-NHS-PEG₄₅ a un exceso molar de 50:1, 100:1 y 200:1, en todos los casos mostró un nivel de actividad enzimática similar al de la prh- α -GAL-I nativa. Como se muestra en el presente documento, en algunos casos se observaron disminuciones moderadas y aumentos moderados en la actividad, lo cual puede ser el

resultado de efectos de formulación. Estos resultados indican que la reticulación no reducía la actividad de prh- α -GAL-I.

Tabla 1: resultados de actividad de α -GAL I humana recombinante vegetal reticulada

Muestra	Reactivo	Exceso molar	Actividad mg/ml
patrón	-	-	2
1	Bis-NHS-PEG ₅	50:1	2,25
2	Bis-NHS-PEG ₅	100:1	1,30
3	Bis-NHS-PEG ₅	200:1	1,24
4	Bis-NHS-PEG ₄₅	50:1	2,82
5	Bis-NHS-PEG ₄₅	100:1	2,76
6	Bis-NHS-PEG ₄₅	200:1	3,48
7	Bis-NHS-PEG ₈	50:1	2,18
8	Bis-NHS-PEG ₈	100:1	2,43
9	Bis-NHS-PEG ₈	200:1	1,82

5 La actividad de la prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ se verificó adicionalmente usando el ensayo de trihexósido de *N*-dodecanoil-NBD-ceramida descrito en el presente documento anteriormente, que ensaya la actividad de α -GAL hacia su sustrato natural, trihexósido de ceramida (Gb₃). La α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® se ensayó con fines comparativos.

10 Como se muestra en la Figura 11, después de la incubación de la α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con el sustrato fluorescente, casi todo el sustrato se transformó en el producto, *N*-dodecanoil-nitrobenzoxadiazol-lactosil ceramida, de forma similar a la reacción catalizada por la α -GAL recombinante de mamífero (Replagal®). Este resultado confirma que la reticulación no alteraba la eficacia hidrolítica enzimática de la prh- α -GAL-I, usando un análogo próximo del sustrato natural.

15 *Ejemplo IV*

Estabilidad in vitro de la α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada

20 La estabilidad *in vitro* de la α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-I) reticulada, obtenida como se describe en el Ejemplo II, se midió a diversas concentraciones como se describe en el presente documento anteriormente en la Sección de Materiales y Métodos. La estabilidad de las α -GAL humanas recombinantes comerciales Fabrazyme® y Replagal® se midió con fines comparativos.

25 Como se muestra en las Figuras 12A-12C, la estabilidad de la α -GAL-I humana recombinante vegetal en condiciones lisosómicas simuladas se potenció reticulando con bis-NHS-PEG₅ (Figura 12A), bis-NHS-PEG₈ (Figura 12B) y bis-NHS-PEG₄₅ (Figura 12C). Como también se muestra en el presente documento, la estabilidad de la prh- α -GAL-I reticulada durante el transcurso de una semana se comparaba favorablemente con la estabilidad de la α -GAL humana recombinante comercial. Después de una pequeña disminución en la actividad residual durante las primeras 24 horas, la prh- α -GAL-I reticulada mantuvo la actividad, incluso después de 10 días. La disminución inicial en la actividad, observada durante las 24 primeras horas, puede reflejar la parte de α -GAL-I humana recombinante vegetal que no experimentaba reticulación.

30 Como se muestra adicionalmente en las Figuras 12A-12C, prh- α -GAL-I reticulada por bis-NHS-PEG₄₅ mostró la mayor estabilidad en condiciones lisosómicas simuladas.

La estabilidad de la α -GAL-I humana recombinante vegetal en plasma humano a 37 °C también se potenció reticulando con bis-NHS-PEG₄₅ (datos no mostrados).

35 Estos resultados indican que la reticulación de α -GAL como se describe en el presente documento puede aumentar la eficacia de α -GAL *in vivo* aumentando la estabilidad de α -GAL en los lisosomas, permitiéndose de este modo que la α -GAL actúe durante un período de tiempo más prolongado en los lisosomas, y aumentando la estabilidad de la α -GAL en la sangre, aumentando de este modo la semivida en circulación de α -GAL.

40 *Ejemplo V*

Farmacocinética in vivo y biodistribución de α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada

45 La farmacocinética y biodistribución de la α -GAL-I humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-I) reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ o bis-NHS-PEG₈ como se describe en el Ejemplo II se determinó en ratones con la enfermedad de Fabry a los que se inyectaron 2 mg/kg de α -GAL, como se describe en el presente documento anteriormente en la Sección de Materiales y Métodos. La farmacocinética y biodistribución de la α -GAL-I humana recombinante vegetal no reticulada y la α -GAL humana recombinante Replagal® se determinó con fines comparativos. Se recogieron

muestras de sangre para análisis farmacocinético 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 120 minutos después de la inyección. Para cada tipo de α -GAL, el grupo de tratamiento consistió en seis ratones.

- 5 Como se muestra en la Tabla 2 presentada a continuación, la prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₈ y con bis-NHS-PEG₄₅ aumentó la semivida terminal en circulación de la α -GAL-I humana recombinante vegetal, exhibiendo la última un efecto más pronunciado.

Tabla 2: semividas terminales en circulación de la α -GAL recombinante

Muestra de α -GAL	t _{1/2} (minutos)
α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal®	8,1
α -GAL-I humana recombinante vegetal	4,8
α -GAL I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG ₈	6,2
α -GAL I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG ₄₅	90

- 10 Como se muestra en la Figura 13 y en la Tabla 2, la semivida terminal de prh α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ era considerablemente mayor que la semivida terminal de α -GAL Replagal®.
 Como se muestra adicionalmente en la Figura 13, la actividad de α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ al cabo de 20 minutos fue de aproximadamente 40 % de la actividad a 1 minuto. Adicionalmente, la prh- α -GAL-I reticulada mostró una presencia activa en plasma incluso 4 horas después de la
 15 inyección.

Estos resultados indican que la prh- α -GAL-I reticulada permanece activa *in vivo* durante un tiempo relativamente prolongado, lo que permite que la enzima alcance tejidos y órganos adicionales.

- 20 Como se muestra en las Figuras 14A y 14B, los niveles de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ y bis-NHS-PEG₄₅ en los bazo de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de inyección fue considerablemente mayor que los de la α -GAL-I recombinante vegetal no reticulada, así como los de la α -GAL recombinante de mamífero Replagal®. Como adicionalmente se muestra en el presente documento, los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ eran mayores que los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₈. Los análisis de transferencia de Western (Figura 14B) son coherentes con los resultados de biodistribución
 25 obtenidos mediante el ensayo de la actividad enzimática α -GAL (Figura 14A).

- 30 Como se muestra en las Figuras 15A y 15B, los niveles de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ y bis-NHS-PEG₄₅ en los hígados de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección eran considerablemente más altos que los de α -GAL-I recombinante vegetal no reticulada, pero menores que los niveles de α -GAL recombinante de mamífero Replagal® en el hígado. Como se muestra adicionalmente en el presente documento, los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ eran ligeramente mayores que los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₈. Los análisis de transferencia de Western (Figura 15B) son coherentes con los resultados de biodistribución obtenidos ensayando la actividad enzimática de α -GAL (Figura 15A).
 35

Pueden ser terapéuticamente ventajosos niveles más bajos de α -GAL en el hígado, ya que aproximadamente el 95 % de la enzima recuperada en la terapia de reemplazo enzimático se encuentra típicamente en el hígado, y por lo tanto altos niveles de recombinación de α -GAL en el hígado indican niveles más bajos de α -GAL exógena en órganos diana tales como corazón y riñones.
 40

- 45 Como se muestra en la Figura 16, los niveles de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ y bis-NHS-PEG₄₅ en los corazones de ratones con la enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección eran mayores que los de la α -GAL-I recombinante vegetal no reticulada. Como se muestra adicionalmente en el presente documento, los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ fueron mayores que los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₈, así como los niveles de la α -GAL recombinante de mamífero Replagal®.

- 50 Como se muestra en la Figura 17, los niveles de la α -GAL-I recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₈ y bis-NHS-PEG₄₅ en los riñones de ratones con enfermedad de Fabry 2 horas después de la inyección, eran mayores que los niveles de la α -GAL-I recombinante vegetal no reticulada. Como adicionalmente se muestra en el presente documento, los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ fueron mayores que los niveles de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₈, así como los niveles de α -GAL recombinante de mamífero Replagal®.

- 55 De manera similar, como se muestra en las Figuras 18-21, los niveles de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ eran mayores que los niveles de la α -GAL-I recombinante vegetal no reticulada en el bazo (Figura 18), hígado (Figura 19), corazón (Figura 20) y riñones (Figura 21) de ratones con enfermedad de Fabry, durante hasta 7 días después de la inyección. Como adicionalmente se muestra en el presente documento, los niveles de α -GAL-I recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ eran mayores que los niveles de la α -GAL recombinante de mamífero Replagal® en el bazo, corazón y riñones.

Estos resultados indican que α -GAL reticulada con bis-NHS-PEG, particularmente bis-NHS-PEG₄₅, exhibe una captación potenciada en órganos, incluyendo riñones y corazón, que son órganos diana principales en el tratamiento del trastorno de Fabry. Estos resultados coinciden con una semivida en circulación aumentada y una estabilidad aumentada de la α -GAL reticulada.

5

Ejemplo VI

Reticulación de α -GAL humana recombinante de mamífero con bis-N-hidroxisuccinimida-poli(etilenglicol) (bis-NHS-PEG)

10

Para confirmar los efectos ventajosos de la reticulación descrita en el presente documento anteriormente, se reticuló la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal®, que se produce en la línea de fibrosarcoma humana HT-1080.

15

Se añadieron 333 μ l de tampón fosfato (100 mM, pH 8) con D-(+)-galactosa 100 mg/ml a 3,8 mg de bis-NHS-PEG₄₅ en 151 μ l de solución de DMSO (25 mg/ml) y 1,8 mg de α -GAL humana recombinante Replagal® en 130 μ l de tampón citrato (25 mM, pH 6). La concentración de α -GAL Replagal® se determinó mediante un ensayo de actividad. La mezcla de reacción se agitó usando un agitador orbital durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de reactivo de reticulación bis-NHS-PEG₄₅ se retiró por diálisis frente a solución salina usando un concentrador Vivaspin 6 con un límite de 50 KDa. La actividad α -GAL de la α -GAL Replagal® reticulada indicó que la concentración de α -GAL era de 3 mg/ml.

20

25

Los productos de reacción se analizaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), IEF (isoelectroenfoque) y espectrometría de masas MALDI-TOF, como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

30

Como se muestra en la Figura 22, la α -GAL Replagal® nativa patrón se observó como un monómero después de electroforesis en gel, mientras que después de la reacción de α -GAL Replagal® con bis-NHS-PEG₄₅, la α -GAL apareció en forma de un dímero, lo que indicaba que los dos monómeros estaban ligados covalentemente por reticulación con bis-NHS-PEG.

35

Como se muestra en la Figura 23, la reacción de α -GAL Replagal® con bis-NHS-PEG₄₅ redujo el punto isoeléctrico (pI) de α -GAL, confirmando de este modo que bis-NHS-PEG está unido covalentemente a la α -GAL.

40

Como se muestra en la Figura 24, la reacción de α -GAL Replagal® con el agente de reticulación bis-NHS-PEG₄₅ aumentó el peso molecular del dímero de α -GAL Replagal® de 103,0 KDa a 121,3 KDa, determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF. El aumento del peso molecular indica una adición de aproximadamente 9-10 moléculas de bis-NHS-PEG₄₅ al dímero α -GAL, que es similar a los resultados descritos anteriormente en el presente documento para prh- α -GAL-I.

Ejemplo VII

Actividad de α -GAL humana recombinante de mamífero reticulada

45

Para determinar si la reticulación de α -GAL recombinante de mamífero descrita en el Ejemplo VI afectaba a la actividad enzimática, la α -GAL reticulada se ensayó con respecto a su actividad enzimática usando un ensayo de *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (*p*NP-G), de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento.

50

Como se muestra en la Figura 25 y en la Tabla 3 mostrada a continuación, la α -GAL humana recombinante de mamífero que se reticuló con bis-NHS-PEG₄₅ exhibió parámetros de actividad enzimática que eran muy similares a los de la α -GAL humana recombinante de mamífero nativa. Estos resultados indican que la reticulación no afectaba significativamente a la actividad o a la maquinaria catalítica y mecanismo de la α -GAL humana recombinante de mamífero.

55

Tabla 3: resultados de actividad de la α -GAL humana recombinante de mamífero reticulada

Muestra	K_M (μ M)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ M/minuto)	k_{cat} (segundo ⁻¹)	k_{cat}/K_M (segundo ⁻¹ * μ M ⁻¹)
α -GAL Replagal®	3212±98	4,20±0,05	67,2±1	0,0209±0,001
α -GAL Replagal® reticulada	3419±162	4,43±0,07	70,9±1	0,0210±0,001

Ejemplo VIII

60

Estabilidad in vitro de la α -GAL humana recombinante de mamífero reticulada

La estabilidad *in vitro* de la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® reticulada, obtenida como se describe en el Ejemplo VI, se midió en diversas condiciones como se describe anteriormente en el presente documento en la Sección de Materiales y Métodos. La estabilidad de α -GAL Replagal® no reticulada se midió con fines comparativos, para evaluar el efecto de la reticulación.

Como se muestra en las Figuras 26A y 26B, la estabilidad de α -GAL humana recombinante de mamífero en condiciones lisosómicas simuladas (Figura 26A) y en plasma humano (Figura 26B) se potenció considerablemente por reticulación con bis-NHS-PEG₄₅. La α -GAL humana recombinante de mamífero reticulada exhibió una mayor estabilidad en condiciones lisosómicas estimuladas que en plasma.

Estos resultados indican que la reticulación de α -GAL como se describe en el presente documento puede estabilizar la α -GAL recombinante de múltiples fuentes y plataformas de expresión.

Ejemplo IX

Farmacocinética in vivo y biodistribución de la α -GAL humana recombinante de mamífero reticulada

La farmacocinética y biodistribución de la α -GAL humana recombinante de mamífero reticulada descrita en el Ejemplo VI se determinó midiendo la actividad α -GAL en el bazo, hígado, corazón y riñones de ratones con enfermedad Fabry 2 horas, 7, 14 y 28 días después de inyección, así como los niveles de Gb₃ en estos órganos, como se describe anteriormente en el presente documento en la Sección de Materiales y Métodos. La biodistribución de la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® no reticulada se determinó para fines comparativos.

Como se muestra en las Figuras 27A-27D, los niveles de la α -GAL recombinante de mamífero reticulada en los bazos (Figura 27A), hígado (Figura 27B), corazón (Figura 27C) y riñones (Figura 27D) de ratones con enfermedad de Fabry fueron considerablemente superiores que los de la α -GAL recombinante de mamífero no reticulada.

Como se muestra en las Figuras 28A-28D, la α -GAL recombinante de mamífero reticulada disminuyó los niveles de Gb₃ en el corazón (Figura 28A), riñones (Figura 28B), hígado (Figura 28C) y bazo (Figura 28D) de ratones con enfermedad de Fabry, durante el transcurso de 28 días después de inyección. La α -GAL recombinante de mamífero reticulada disminuyó los niveles de Gb₃ en un grado mayor que la α -GAL recombinante no reticulada en el riñón (Figura 28B) y bazo (Figura 28D) de ratones con la enfermedad de Fabry, y a aproximadamente el mismo grado que la α -GAL recombinante de mamífero no reticulada en el corazón (Figura 28A) e hígado (Figura 28C).

Estos resultados indican que la reticulación con bis-NHS-PEG da como resultado una captación considerablemente potenciada de la α -GAL recombinante desde una variedad de fuentes y plataformas de expresión en órganos, incluyendo el riñón y corazón, que son órganos diana principales en el tratamiento del trastorno de Fabry. Adicionalmente, estos resultados indican que la reticulación con bis-NHS-PEG da como resultado una disminución más sustancial de los niveles de Gb₃ en órganos.

Ejemplo X

Reticulación de α -GAL-II humana recombinante vegetal con bis-N-hidroxisuccinimida-poli(etilenglicol) (bis-NHS-PEG)

La α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-II), que carece de los aminoácidos EF presentes en el extremo N de prh- α -GAL-I, se reticuló con bis-NHS-PEG₄₅, bis-NHS-PEG₂₁ o bis-NHS-PEG₆₈ a una proporción molar de 200:1 de bis-NHS-PEG a α -GAL, de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo II.

La prh- α -GAL-II conservó su actividad biológica después de la reticulación con bis-NHS-PEG (datos no mostrados).

Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) y espectrometría de masas MALDI-TOF como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Como se muestra en las Figuras 29A-29B, la prh- α -GAL-II nativa patrón se observó como un monómero después de la electroforesis en gel, mientras que después de la reacción de prh- α -GAL-II con bis-NHS-PEG₄₅ o bis-NHS-PEG₂₁ (Figura 29A), o con bis-NHS-PEG₆₈ (Figura 29B), prh- α -GAL-II apareció principalmente en forma de un dímero (con algún monómero presente), indicando que los dos monómeros estaban ligados de manera covalente por reticulación con un agente de reticulación bis-NHS-PEG.

Como se observa adicionalmente en las Figuras 29A-29B, para cada uno de los agentes de reticulación ensayados, el peso molecular de la parte monomérica de prh- α -GAL-II aumentó después de la reacción con el agente de reticulación. El aumento del peso molecular fue mayor para bis-NHS-PEG₄₅ que para bis-NHS-PEG₂₁ (Figura 29A) y fue más elevado para bis-NHS-PEG₆₈ (compárese la Figura 29A con la Figura 29B). Estos resultados indican que los monómeros que no dimerizaron por reticulación, estaban unidos de manera covalente al agente de reticulación bis-NHS-PEG, es decir, las proteínas estaban PEGiladas.

Como se muestra en las Figuras 30A-30C, la reacción de prh- α -GAL-II con el agente de reticulación bis-NHS-PEG₂₁ aumentó el peso molecular del dímero prh- α -GAL-II de 95 KDa (Figura 30A) a 109 KDa (Figura 30B), aunque la reacción de prh- α -GAL-II con el agente de reticulación bis-NHS-PEG₄₅ aumentó el peso molecular del dímero prh- α -GAL-II a 114 KDa (Figura 30C), determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF. El aumento del peso molecular indica una adición de aproximadamente 13 moléculas de bis-NHS-PEG₂₁, o de aproximadamente 9 moléculas de bis-NHS-PEG₄₅ al dímero prh- α -GAL-II.

Ejemplo XI

10 Estabilidad *in vitro* de la α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada

La estabilidad *in vitro* de la α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-II) reticulada obtenida como se describe en el Ejemplo X se midió en diversas condiciones como se describe en el presente documento anteriormente en la Sección de Materiales y Métodos. La estabilidad de la α -GAL humana recombinante comercial Replagal® se midió con fines comparativos.

Como se muestra en las Figuras 31A-31D, la estabilidad de la α -GAL-II humana recombinante vegetal se potenció reticulando con bis-NHS-PEG₆₈ (Figuras 31B y 31D), bis-NHS-PEG₄₅ (Figuras 31A -31D) o bis-NHS-PEG₂₁ (Figuras 31A y 31C), tanto en condiciones lisosómicas simuladas (Figuras 31A y 31B) como en plasma humano (Figuras 31C y 31D). Los diferentes agentes de reticulación potenciaron la estabilidad de prh- α -GAL-II en grados comparables. Como se muestra adicionalmente en el presente documento, la estabilidad de la prh- α -GAL-II reticulada fue mayor que la estabilidad de la α -GAL humana recombinante Replagal®. La prh- α -GAL-II reticulada exhibió una mayor estabilidad en condiciones lisosómicas simuladas, así como en condiciones plasmáticas.

Como se muestra adicionalmente en las Figuras 31A-31D, la prh- α -GAL-II no reticulada es considerablemente más estable que la prh- α -GAL-I no reticulada (véanse las Figuras 1 y 3 para comparación), tanto en condiciones lisosómicas simuladas (Figuras 1 y 31A-31B) como en plasma humano (Figuras 3 y 31C-31D), aunque prh- α -GAL-II aún presenta alguna inestabilidad.

Estos resultados indican que la reticulación de α -GAL como se describe en el presente documento puede estabilizar diferentes tipos de α -GAL.

Ejemplo XII

35 Farmacocinética y biodistribución *in vivo* de la α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada

La farmacocinética y biodistribución de α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-II) reticulada con PEG₄₅ y reticulada con PEG₂₁, descrita en el Ejemplo X, se determinó midiendo la actividad α -GAL en plasma y en órganos como se ha descrito anteriormente en el presente documento en la Sección de Materiales y Métodos. La farmacocinética y biodistribución de la α -GAL humana recombinante de mamífero Replagal® no reticulada se determinó con fines comparativos.

Se recogieron muestras de sangre para análisis farmacocinéticos a 1, 5, 10, 30, 60, 120, 240, 480 y 1440 minutos después de inyección de ratones con enfermedad de Fabry con 1 mg/kg de α -GAL.

La biodistribución de α -GAL se determinó recogiendo el hígado, riñones, corazón y bazo de ratones con enfermedad de Fabry 2 horas, 7 días, 14 días y 28 días después de la inyección con 2 mg/kg de α -GAL.

Como se muestra en las Figuras 32A y 32B y en la Tabla 4, la reticulación de prh- α -GAL-II con bis-NHS-PEG₄₅ aumentó considerablemente la semivida terminal en circulación de prh- α -GAL-II, dando lugar a una semivida en circulación considerablemente mayor que la de la α -GAL recombinante de mamífero o prh- α -GAL-II no reticulada.

Tabla 4: semivida terminal en circulación de α -GAL recombinante

Artículo de ensayo	t _{1/2} (min)
α -GAL Replagal®	13,3
alfa-GAL-II recombinante vegetal	4,8
alfa-GAL-II recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG ₄₅	581,6

Como se muestra en las Figuras 33A-33L, la reticulación de prh- α -GAL-II con bis-NHS-PEG₄₅ aumentó la captación de prh- α -GAL-II en corazón (Figura 33A), riñón (Figura 33B), hígado (Figura 33C) y bazo (Figura 33D) de ratones con enfermedad de Fabry, aunque en un menor grado en el hígado.

Como se muestra en las Figuras 33E-33L, la reticulación de prh- α -GAL-II con bis-NHS-PEG₂₁ también aumentó la captación de prh- α -GAL-II en corazón (Figuras 33E y 33I), riñón (Figuras 33F y 33J), hígado (Figuras 33G y 33K) y

bazo (Figuras 33H y 33L) de ratones con enfermedad de Fabry, aunque dicho aumento no era siempre evidente después de solo 2 horas.

5 Como adicionalmente se ha observado en el presente documento, los niveles de prh- α -GAL-II reticulada fueron mayores que los niveles de α -GAL recombinante de mamífero en el corazón (Figuras 33A, 33E y 33I), riñón (Figuras 33B, 33F Y 33J) y bazo (Figuras 33D, 33H y 33L) de ratones con enfermedad de Fabry, y menores que los niveles de α -GAL recombinante de mamífero en el hígado (Figuras 33C, 33G y 33K).

10 Estos resultados indican que la prh- α -GAL-II reticulada exhibe una actividad considerablemente potenciada de α -GAL en plasma y en diversos órganos, particularmente en órganos distintos de hígado.

Ejemplo XIII

Efecto del pH sobre la actividad de α -GAL humana recombinante vegetal

15 El pH del entorno tiene un efecto significativo sobre la estabilidad y cinética de enzimas lisosómicas tales como α -GAL. El pH puede afectar a la unión del sustrato con la enzima. El pH también puede afectar a la protonación o desprotonación de grupos catalíticos, tales como grupos carboxilo o amino, que forman parte del sitio activo enzimático y, por lo tanto, afectan al comportamiento cinético de la enzima. La estabilidad de la estructura terciaria o cuaternaria de las enzimas también es dependiente del pH, y afecta a la velocidad de la reacción enzimática, especialmente a valores de pH extremadamente ácidos o alcalinos.

20 La actividad de α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada con PEG₄₅ y no reticulada se determinó a diversos valores de pH usando un sustrato pNP-G, para examinar la dependencia del pH de la actividad α -GAL, y el efecto de la reticulación en el mismo. Las mediciones se realizaron en soluciones de citrato 20 mM y de fosfato de sodio 30 mM.

25 Los parámetros cinéticos que caracterizan la actividad α -GAL a diversos valores de pH se resumen en la Tabla 5 a continuación y en las Figuras 34A-34C.

30 Como se observa en las Figuras 34A-34C, la reticulación del α -GAL-II aumentó los parámetros de $V_{\text{máx}}$ (Figura 34A) y k_{cat} (Figura 34C) y no tuvo un efecto significativo sobre el parámetro K_M (Figura 34B).

35 Tabla 5: resultados de actividad de la α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-II) no reticulada y α -GAL II humana recombinante vegetal reticulada con PEG₄₅ (prh- α -GAL-II-CL45) a diversos valores de pH.

pH	Muestra	K_M (μM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M}/\text{minuto}$)	k_{cat} (segundo^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{segundo}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$)
2,8	prh-a-GAL-II	15216	0,57	9,04	0,0006
	prh-a-GAL-I I-CL45	13618	0,90	14,37	0,0011
3,2	prh-a-GAL-II	11476	0,55	8,85	0,0008
	prh-a-GAL-I I-CL45	8489	1,34	21,44	0,0025
3,6	prh-a-GAL-TI	11147	1,76	28,16	0,0025
	prh-a-GAL-I I-CL45	4699	2,23	35,68	0,0076
4,04	prh-a-GAL-II	5709	1,98	31,68	0,0055
	prh-a-GAL-I I-CL45	3207	2,74	43,76	0,0136
4,4	prh-a-GAL-II	4596	2,40	38,40	0,0084
	prh-a-GAL-I I-CL45	3122	3,22	51,57	0,0165
4,8	prh-a-GAL-II	4531	2,32	37,12	0,0082
	prh-a-GAL-I I-CL45	3345	2,95	47,23	0,0141
5,29	prh-a-GAL-II	6793	2,06	32,99	0,0049
	prh-a-GAL-I I-CL45	3973	2,78	44,48	0,0112
5,66	prh-a-GAL-II	10396	1,75	28,05	0,0027
	prh-a-GAL-I I-CL45	4883	2,70	43,20	0,0088
6,09	prh-a-GAL-II	11357	1,44	23,04	0,0020
	prh-a-GAL-I I-CL45	8336	1,54	24,59	0,0030
6,4	prh-a-GAL-II	21046	1,32	21,12	0,0010
	prh-a-GAL-I I-CL45	16844	1,46	23,36	0,0014
6,76	prh-a-GAL-II	25188	1,12	17,92	0,0007
	prh-a-GAL-I I-CL45	18313	1,14	18,24	0,0010
7,36	prh-a-GAL-II	-	-	-	-
	prh-a-GAL-I I-CL45	32692	0,52	8,37	0,0003

La potenciación de los parámetros $V_{\text{máx}}$ y k_{cat} indica un aumento en la actividad catalítica. Este aumento es particularmente significativo a valores de pH de al menos aproximadamente 7, donde la actividad catalítica de la α -GAL-II no reticulada es insignificante.

K_M es un parámetro cinético asociado con la afinidad enzima/sustrato. La ausencia de un efecto significativo de reticulación sobre los valores de K_M indica que la reticulación no tiene un efecto significativo sobre la afinidad de α -GAL con respecto al sustrato pNP-G.

5 *Ejemplo XIV*

Efecto de la PEGilación sobre la estabilidad de α -GAL

10 Se determinó el efecto de la PEGilación por sí mismo sobre la estabilidad de α -GAL, para determinar si el efecto estabilizante de los agentes de reticulación de PEG es debido a las propiedades del PEG o es debido a la reticulación.

15 Se hizo reaccionar α -GAL-I humana recombinante vegetal con PEG protegidos terminalmente con metoxi activado con *N*-hidroxisuccinimida (NHS) con diferentes pesos moleculares (2, 5 y 10 KDa). Dichos reactivos PEG tienen un solo grupo NHS y, por consiguiente, PEGilan la proteína sin formar reticulación. Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE.

20 Como se muestra en la Figura 35, los agentes de PEGilación protegidos con metoxi PEGilaron la α -GAL (visible como un aumento en el peso molecular de α -GAL), pero no generaron sustancialmente dímeros de α -GAL, lo que indicaba que α -GAL no estaba reticulada.

Como se muestra en las Figuras 36A y 36B, la PEGilación de la α -GAL-I humana recombinante vegetal sin formar reticulación no aumentó sustancialmente la estabilidad de la α -GAL recombinante vegetal, en condiciones lisosómicas simuladas (Figura 36A) o en plasma humano (Figura 36B).

25 Estos resultados indican que el efecto estabilizante de la reticulación descrita en el presente documento anteriormente no es un resultado de la PEGilación por sí misma.

Ejemplo XV

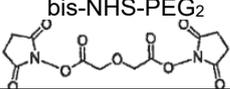
30 *Efecto de la longitud de la cadena de PEG sobre la actividad de α -GAL reticulada*

35 Para evaluar el efecto de la longitud de la cadena de los agentes de reticulación PEG sobre la actividad α -GAL, la α -GAL-I humana recombinante vegetal se reticuló con agentes bis-NHS-PEG₂, bis-NHS-PEG₄, bis-NHS-PEG₆₈ y bis-NHS-PEG₁₅₀, usando esencialmente los mismos procedimientos que se han descrito en el Ejemplo II (PEG₆₈ y PEG₁₅₀ tienen longitudes de cadena aproximadas). La α -GAL-I se reticuló a proporciones molares de 50:1, 100:1 y 200:1 de bis-NHS-PEG: α -GAL. Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. También se analizó la α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ como se describe en el Ejemplo II con fines comparativos.

40 Como se muestra en la Figura 37, el análisis de SDS-PAGE mostró que todos los agentes de bis-NHS-PEG reticularon la α -GAL para dar como resultado un dímero reticulado covalentemente, y que la reticulación era más eficaz cuando se usaba una proporción molar de 200:1.

45 La actividad enzimática de α -GAL-I reticulada se determinó después como se describe en el Ejemplo III. Los resultados se resumen en la Tabla 6 mostrada a continuación.

Tabla 6: resultados de actividad de la α -GAL-I humana recombinante vegetal reticulada

Reactivo	Proporción molar (reactivo: α -GAL-I)	Actividad α -GAL esperada [mg/ml]	Actividad α -GAL medida [mg/ml]
 bis-NHS-PEG ₂	50:1	2	1,159
	100:1	2	1,001
	200:1	2	0,970
bis-NHS-PEG ₄	50:1	2	1,399
	100:1	2	1,333
	200:1	2	1,048
bis-NHS-PEG ₆₈	50:1	2	1,822
	100:1	2	2,252
	200:1	2	2,425
bis-NHS-PEG ₁₅₀	50:1	2	1,804
	100:1	2	2,031
	200:1	2	1,825

Como se muestra en la Tabla 6, la reticulación con PEG₂ y PEG₄ redujo moderadamente la actividad α-GAL (aproximadamente un 30-50 %), mientras que la reticulación con cadenas de PEG más largas no afectó significativamente a la actividad α-GAL.

5 Estos resultados indican que la reticulación con cadenas de PEG más largas que PEG₄ es ventajosa en términos de preservar la actividad de la α-GAL reticulada.

Ejemplo XVI

10 *Reticulación de α-GAL usando agentes bis-COOH-PEG*

Como una alternativa a la reticulación anteriormente descrita de α-GAL usando agentes previamente preparados de bis-NHS-PEG (por ejemplo, disponibles en el mercado), α-GAL se reticuló con agentes bis-COOH-PEG activando los grupos carboxilo (es decir, COOH) *in situ* inmediatamente antes de efectuar la reacción de reticulación.

15 Cada uno de bis-COOH-PEG₁₂, bis-COOH-PEG₂₈ y bis-COOH-PEG₄₅ se activaron reaccionando con 1,1 equivalentes molares por grupo carboxilo (es decir, 2,2 equivalentes molares por bis-COOH-PEG) de NHS (*N*-hidroxisuccinimida) y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). La mezcla de reacción se agitó después en DMSO durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se hizo reaccionar bis-COOH-PEG activado, que es esencialmente bis-NHS-PEG, con α-GAL-I humana recombinante vegetal a proporciones molares de 50:1, 100:1 y 200:1, como se describe en el Ejemplo II. Los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE, como se describe anteriormente en el presente documento. La α-GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ como se describe en el Ejemplo II también se analizó con fines comparativos.

25 Como se muestra en la Figura 38, el análisis de SDS-PAGE mostró que todos los agentes bis-COOH-PEG reticulaban la α-GAL en algún grado, pero que la reticulación era más eficaz cuando se usaba una proporción molar de 200:1.

30 Después se determinó la actividad enzimática de la α-GAL-I reticulada como se describe en el Ejemplo III. En la Tabla 7 a continuación se resumen los resultados.

Tabla 7: resultados de actividad de α-GAL-I humana recombinante vegetal reticulada

Reactivo	Proporción molar (reactivo: α-GAL-I)	Actividad α-GAL esperada [mg/ml]	Actividad α-GAL medida [mg/ml]
Bis-HOOC-PEG ₁₂	50:1	1,5	1,236
	100:1	1,5	1,304
	200:1	1,5	1,404
Bis-HOOC-PEG ₂₈	50:1	1,5	1,326
	100:1	1,5	1,371
	200:1	1,5	1,460
Bis-HOOC-PEG ₄₅	50:1	1,5	1,349
	100:1	1,5	1,541
	200:1	1,5	1,628

35 Como se muestra en la Tabla 7, la reticulación con cada uno de los agentes ensayados bis-COOH-PEG dio como resultado α-GAL con aproximadamente la actividad esperada.

Estos resultados indican que los agentes de reticulación bis-COOH-PEG no reducen la actividad α-GAL en comparación con la reticulación con agentes bis-NHS-PEG.

40 Estos resultados también confirman los hallazgos anteriormente descritos de que la reticulación con cadenas de PEG más largas que PEG₄ no reduce significativamente la actividad de la α-GAL reticulada.

Ejemplo XVII

45 *Efecto de la longitud y tipo de agentes de reticulación sobre la estabilidad in vitro de α-GAL-I humana recombinante vegetal reticulada*

50 Para caracterizar adicionalmente el efecto de la longitud de la cadena sobre la estabilidad de la α-GAL reticulada y para comparar la estabilidad de la α-GAL reticulada con agentes bis-COOH-PEG (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo XVI), con la de α-GAL reticulada con agentes bis-NHS-PEG, se midió la estabilidad *in vitro* de α-GAL-I humana recombinante vegetal (prh-α-GAL-I) reticulada con bis-NHS-PEG₂, bis-NHS-PEG₄, bis-COOH-PEG₁₂, bis-COOH₂₈ y bis-COOH-PEG₄₅, obtenidos como se describe en los Ejemplos XV y XVI, en diversas condiciones como se describe anteriormente en el presente documento en la Sección de Materiales y Métodos, y se comparó con la

estabilidad de prh- α -GAL-I reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ como se describe en el Ejemplo II. La estabilidad de α -GAL humana recombinante comercial Replagal® y prh-GAL-I no reticulada se midió con fines comparativos.

Como se muestra en la Figura 39, la estabilidad de la α -GAL-I humana recombinante vegetal en condiciones lisosómicas simuladas se potenció reticulando con cada uno de los agentes bis-NHS-PEG y bis-COOH-PEG.

Como se muestra adicionalmente en el presente documento, la estabilidad de prh- α -GAL-I reticulado se correlacionó con la longitud de la cadena del agente de reticulación PEG, proporcionando bis-NHS-PEG₄₅ y bis-COOH-PEG₄₅ la mayor estabilidad, y proporcionando bis-NHS-PEG₂ la menor estabilidad. Sin embargo, la reticulación con bis-COOH-PEG₄₅ proporcionó solo marginalmente más estabilidad que la reticulación con bis-COOH-PEG₄₅, lo que sugería que, por encima de una determinada longitud, la estabilidad no se veía afectada por la longitud de la cadena de PEG.

Como se muestra adicionalmente en la Figura 39, la reticulación con bis-NHS-PEG₄₅ proporcionó ligeramente más estabilidad que la reticulación con bis-COOH-PEG₄₅. Esto puede ser el resultado de una activación incompleta del agente bis-COOH-PEG. Sin embargo, la diferencia en la estabilidad fue ligera.

Además, la reticulación con cada uno de los agentes bis-NHS-PEG y bis-COOH-PEG potenció la estabilidad de la α -GAL-I humana recombinante vegetal en plasma humano a 37 °C (datos no mostrados).

Estos resultados proporcionan pruebas adicionales de que la reticulación de α -GAL como se describe en el presente documento puede aumentar la eficacia de α -GAL *in vivo* aumentando la estabilidad de α -GAL en lisosomas y en la sangre, y que las cadenas de PEG de aproximadamente 28-45 unidades de longitud son más eficaces estabilizando la α -GAL mediante la reticulación que las cadenas de PEG más cortas.

Ejemplo XVIII

Parámetros cinéticos de α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada

Los parámetros cinéticos de α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada, obtenidos como se describe en el Ejemplo X, así como de α -GAL-II humana recombinante vegetal no reticulada, se determinaron usando un sustrato pNP-G y el análisis de Michaelis-Menten para examinar el efecto de la reticulación sobre la misma. Las mediciones se realizaron en una solución de citrato 20 mM, fosfato de sodio 30 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 % y etanol al 0,67 %, a un pH de 4,6. Los parámetros cinéticos se calcularon usando valores de contenido de proteína basándose en un ensayo de actividad.

Como se muestra en la Tabla 8 a continuación, la reticulación de α -GAL-II dio como resultado propiedades cinéticas mejoradas, en comparación con la α -GAL-II no reticulada. La constante de Michaelis (K_M) se redujo, indicando una mayor afinidad de la enzima por el sustrato. Además, la k_{cat}/K_M , que significa la eficiencia catalítica total de la enzima con su sustrato en las condiciones descritas, se potenció para especies reticuladas.

Tabla 8: parámetros de Michaelis-Menten de α -GAL-II humana recombinante vegetal no reticulada (prh- α -GAL-II) y α -GAL II humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₂₁ (prh- α -GAL-II-CL21), bis-NHS-PEG₄₅ (prh- α -GAL-II-CL45) o bis-NHS-PEG₆₈ (prh- α -GAL-II-CL68)

Muestra	K_M (μ M)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ M/min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu$ M ⁻¹)
prh- α -GAL-II	4801	4,59	73,49	0,015
prh- α -GAL-II-CL21	2661	4,85	77,55	0,029
prh- α -GAL-II-CL45	2583	4,87	77,87	0,030
prh- α -GAL-II-CL68	2556	4,12	65,97	0,026

Ejemplo XIX

Reproducibilidad de la reticulación de α -GAL-II humana recombinante vegetal

La reproducibilidad lote a lote de la reticulación se evaluó después de preparar 5 lotes de α -GAL-II humana recombinante vegetal (prh- α -GAL-II) reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ a una proporción de 200:1, usando procedimientos similares a los descritos en el Ejemplo II.

En los lotes 1, 2, 4 y 5, se hizo reaccionar 1 mg de prh- α -GAL-II con 3,98 mg de bis-NHS-PEG.

En el lote 3, se hicieron reaccionar 20,5 mg de prh- α -GAL-II con 80,7 mg de bis-NHS-PEG.

La actividad enzimática de prh- α -GAL-II reticulada se determinó como se describe en el Ejemplo III. Los resultados se resumen en la Tabla 9 mostrada a continuación.

Tabla 9: resultados de actividad de α -GAL-II humana recombinante vegetal reticulada de diferentes lotes

Lote n.º	Actividad α -GAL esperada [mg/ml]	Actividad α -GAL medida [mg/ml]
1	1,25	1,38
2	1,25	1,23
3	1,43	1,4
4	1,25	0,85
5	1,25	1,11

Como se muestra en la Tabla 9, la actividad medida estaba próxima a la actividad esperada en los 5 lotes. En 4 de los 5 lotes, la actividad medida difirió de la actividad esperada aproximadamente un 10 % o menos.

5

Estos resultados indican que la actividad obtenida de la prh- α -GAL-II reticulada es relativamente predecible y reproducible.

La estabilidad de prh- α -GAL-II reticulada en condiciones lisosómicas y en plasma humano se determinó como se describe anteriormente en el presente documento.

10

Como se muestra en las Figuras 40A y 40B, la estabilidad de prh- α -GAL-II reticulada exhibió una buena reproducibilidad tanto en condiciones lisosómicas simuladas como en plasma humano.

La reticulación también se analizó por análisis SDS-PAGE, análisis IEF (isoelectroenfoco) y espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe anteriormente en el presente documento. Se analizó prh- α -GAL-II no reticulada para la comparación.

15

Como se muestra en la Figura 41, la prh- α -GAL-II reticulada de los diferentes lotes exhibió el mismo grado de dimerización covalente en análisis SDS-PAGE.

20

Como se muestra en la Figura 42, la prh- α -GAL-II reticulada de los diferentes lotes exhibió los mismos puntos isoeléctricos con análisis IEF.

Como se muestra en las Figuras 43A-43F, las prh- α -GAL-II reticuladas de los lotes 1-5 (FIG. 43B-43F, respectivamente) mostraron, todas ellas, un aumento de aproximadamente 20-21 kDa en la forma de dímero, en comparación con la prh- α -GAL-II no reticulada (FIG. 43A). Dicho aumento corresponde a aproximadamente 10 moléculas de PEG por dímero de α -GAL. Como adicionalmente se muestra en las FIG. 43B-43F, las prh- α -GAL-II reticuladas de los diferentes lotes exhibieron similares proporciones de monómero frente a dímero.

25

Estos resultados indican adicionalmente la buena reproducibilidad en la reticulación de α -GAL.

30

Los parámetros cinéticos de la prh- α -GAL-II reticulada se determinaron usando un sustrato pNP-G y el análisis de Michaelis-Menten para examinar la reproducibilidad de la actividad enzimática. Las mediciones se realizaron en una solución de citrato 20 mM, fosfato de sodio 30 mM, albúmina de suero bovino al 0,1 % y etanol al 0,67 %, a un pH de 4,6. Los parámetros cinéticos se calcularon usando valores de contenido de proteína basándose en la densidad óptica a 280 nm.

35

Como se muestra en la Figura 44, la prh- α -GAL-II reticulada de diferentes lotes exhibió perfiles similares de velocidad catalítica frente a la concentración de sustrato.

40

Como se muestra en la Tabla 10 presentada a continuación, la prh- α -GAL-II reticulada de los diferentes lotes exhibió una buena reproducibilidad de los parámetros $V_{\text{máx}}$ y k_{cat} . El parámetro K_m varió más entre lotes, aunque esto puede ser un artefacto de la cuantificación de la proteína.

Los resultados anteriores indican una buena reproducibilidad en las propiedades enzimáticas de α -GAL reticulada.

45

Tabla 10: parámetros de Michaelis-Menten de la α -GAL II humana recombinante vegetal reticulada con bis-NHS-PEG₄₅ en diferentes lotes

Lote n.º	K_m (μM)	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
1	4939	3,87	61,92	0,0125
2	2215	3,30	52,86	0,0239
3	4470	3,95	63,12	0,0141
4	3285	3,72	59,53	0,018
5	2243	3,91	62,60	0,028

LISTADO DE SECUENCIAS

50

<110> Protalix Ltd.
Shulman, Avidor

Ruderfer, Ilya
 Ben-Moshe, Tehila
 Shekhter, Talia
 Azulay, Yaniv
 Shaaltiel, Yoseph
 Kizhner, Tali

5

<120> ALFA-GALACTOSIDASA ESTABILIZADA Y USOS DE LA MISMA

10

<130> W3080 EP/2

<150> US 61/309.487

<151> 02-03-2010

15

<150> US 61/434.499

<151> 20-01-2011

<150> PCT/IL2010/000956

<151> 17-11-2010

20

<150> US 61/434.503

<151> 20-01-2011

<160> 14

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 405

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Alfa-GAL humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL)

35

<400> 1

Glu Phe Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu
 1 5 10 15

His Trp Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp
 20 25 30

Ser Cys Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val
 35 40 45

Ser Glu Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp
 50 55 60

Cys Trp Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Gln Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His
 85 90 95

ES 2 708 843 T3

Ser Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr
 100 105 110

Cys Ala Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln
 115 120 125

Thr Phe Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr
 130 135 140

Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu
 145 150 155 160

Ala Leu Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro
 165 170 175

Leu Tyr Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln
 180 185 190

Tyr Cys Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys
 195 200 205

Ser Ile Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile
 210 215 220

Val Asp Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val
 225 230 235 240

Ile Gly Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala
 245 250 255

Leu Trp Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg
 260 265 270

His Ile Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile
 275 280 285

Ala Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln
 290 295 300

Gly Asp Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp
 305 310 315 320

Ala Val Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr
 325 330 335

Thr Ile Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala

ES 2 708 843 T3

340 345 350

Cys Phe Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr
 355 360 365

Glu Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val
 370 375 380

Leu Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Ser
 385 390 395 400

Glu Lys Asp Glu Leu
 405

<210> 2
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Alfa-GAL humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL)

<400> 2

5
 10

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
 1 5 10 15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
 20 25 30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
 35 40 45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
 50 55 60

Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
 65 70 75 80

Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
 85 90 95

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
 100 105 110

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe
 115 120 125

Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp
 130 135 140

ES 2 708 843 T3

Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu
145 150 155 160

Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
165 170 175

Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
180 185 190

Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile
195 200 205

Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp
210 215 220

Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
225 230 235 240

Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp
245 250 255

Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile
260 265 270

Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
275 280 285

Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
290 295 300

Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val
305 310 315 320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
325 330 335

Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
340 345 350

Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
355 360 365

Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
370 375 380

Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ser Glu

ES 2 708 843 T3

385 390 395 400

Lys Asp Glu Leu

<210> 3
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Alfa-GAL humana recombinante vegetal (prh-alfa-GAL)

<400> 3

Gly Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His
 1 5 10 15

Trp Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser
 20 25 30

Cys Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser
 35 40 45

Glu Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys
 50 55 60

Trp Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro
 65 70 75 80

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

Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys
 100 105 110

Ala Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr
 115 120 125

Phe Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys
 130 135 140

Asp Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Leu Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu
 165 170 175

Tyr Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr
 180 185 190

ES 2 708 843 T3

Cys Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser
 195 200 205

Ile Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val
 210 215 220

Asp Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile
 225 230 235 240

Gly Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu
 245 250 255

Trp Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His
 260 265 270

Ile Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala
 275 280 285

Ile Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly
 290 295 300

Asp Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala
 305 310 315 320

Val Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr
 325 330 335

Ile Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys
 340 345 350

Phe Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu
 355 360 365

Trp Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu
 370 375 380

Leu Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Ser
 385 390 395 400

Glu Lys Asp Glu Leu
 405

5 <210> 4
 <211> 753
 <212> PRT
 <213> *Cucumis melo*
 <400> 4

ES 2 708 843 T3

Met Thr Val Gly Ala Gly Ile Thr Ile Ser Asp Ala Asn Leu Thr Val
1 5 10 15

Leu Gly Asn Arg Val Leu Ser Asp Val His Asn Asn Ile Thr Leu Thr
20 25 30

Ala Ala Pro Gly Gly Gly Val Met Asn Gly Ala Phe Ile Gly Val Gln
35 40 45

Ser Asp Gln Ile Gly Ser Arg Arg Val Phe Pro Ile Gly Lys Leu Ile
50 55 60

Gly Leu Arg Phe Leu Cys Ala Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr
65 70 75 80

Gln Arg Met Gly Cys Ser Gly Gln Glu Val Pro Phe Glu Thr Gln Phe
85 90 95

Leu Val Val Glu Thr Arg Asp Gly Ser Asn Ile Ala Gly Asn Gly Glu
100 105 110

Glu Gly Asp Ala Val Tyr Thr Val Phe Leu Pro Ile Leu Glu Gly Asp
115 120 125

Phe Arg Ala Val Leu Gln Gly Asn Asp Asn Asn Glu Ile Glu Ile Cys
130 135 140

Leu Glu Ser Gly Asp Pro Ser Val Asp Gly Phe Glu Gly Ser His Leu
145 150 155 160

Val Phe Val Gly Ala Gly Ser Asp Pro Phe Glu Thr Ile Thr Tyr Ala
165 170 175

Val Lys Ser Val Glu Lys His Leu Gln Thr Phe Ala His Arg Glu Arg
180 185 190

Lys Lys Met Pro Asp Ile Leu Asn Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp
195 200 205

Ala Phe Tyr Thr Asp Val Thr Ser Asp Gly Val Lys Lys Gly Leu Glu
210 215 220

Ser Phe Glu Asn Gly Gly Ile Pro Pro Lys Phe Val Ile Ile Asp Asp
225 230 235 240

Gly Trp Gln Ser Val Ala Lys Asp Ala Thr Ser Ala Asp Cys Lys Ala

ES 2 708 843 T3

				245					250					255			
Asp	Asn	Thr	Ala	Asn	Phe	Ala	Asn	Arg	Leu	Thr	His	Ile	Lys	Glu	Asn		
			260					265					270				
Tyr	Lys	Phe	Gln	Lys	Asp	Gly	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Asn	Pro		
		275					280					285					
Ala	Leu	Gly	Leu	Gln	His	Ile	Val	Ser	Tyr	Met	Lys	Glu	Lys	His	Ala		
	290					295					300						
Thr	Lys	Tyr	Val	Tyr	Val	Trp	His	Ala	Ile	Thr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gly		
305					310					315					320		
Val	Ser	Ala	Gly	Val	Lys	Glu	Met	Glu	Gln	Tyr	Glu	Ser	Lys	Ile	Ala		
				325					330					335			
Tyr	Pro	Val	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Glu	Ser	Asn	Glu	Pro	Cys	Asp	Ala		
			340					345					350				
Leu	Asn	Ser	Ile	Thr	Lys	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Asn	Pro	Glu	Lys		
		355					360					365					
Val	Phe	Asn	Phe	Tyr	Asn	Glu	Gln	His	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ala	Gly		
	370					375					380						
Val	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Asp	Val	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly		
385					390					395					400		
Ala	Gly	His	Gly	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Ala	Arg	Lys	Tyr	His	Gln	Ala		
				405					410					415			
Leu	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Arg	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gly	Ile	Ile	Ser		
			420					425					430				
Cys	Met	Ser	His	Asn	Thr	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Arg	Asn	Ala		
		435					440					445					
Val	Ile	Arg	Ala	Ser	Asp	Asp	Phe	Trp	Pro	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser	His		
	450					455					460						
Thr	Ile	His	Ile	Ala	Ser	Val	Ala	Tyr	Asn	Ser	Leu	Phe	Leu	Gly	Glu		
465					470					475					480		
Phe	Met	Gln	Pro	Asp	Trp	Asp	Met	Phe	His	Ser	Leu	His	Pro	Met	Ala		
				485					490					495			

ES 2 708 843 T3

Glu Tyr His Gly Ala Ala Arg Ala Val Gly Gly Cys Ala Ile Tyr Val
 500 505 510

Ser Asp Lys Pro Gly Gln His Asp Phe Asn Leu Leu Lys Lys Leu Val
 515 520 525

Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg Ala Lys Leu Pro Gly Arg Pro Thr
 530 535 540

Lys Asp Cys Leu Phe Thr Asp Pro Ala Arg Asp Gly Lys Ser Leu Leu
 545 550 555 560

Lys Ile Trp Asn Leu Asn Asp Leu Ser Gly Val Val Gly Val Phe Asn
 565 570 575

Cys Gln Gly Ala Gly Trp Cys Lys Val Gly Lys Lys Asn Leu Ile His
 580 585 590

Asp Glu Asn Pro Asp Thr Ile Thr Gly Val Ile Arg Ala Lys Asp Val
 595 600 605

Ser Tyr Leu Trp Lys Ile Ala Gly Glu Ser Trp Thr Gly Asp Ala Val
 610 615 620

Ile Phe Ser His Leu Ala Gly Glu Val Val Tyr Leu Pro Gln Asp Ala
 625 630 635 640

Ser Met Pro Ile Thr Leu Lys Pro Arg Glu Phe Asp Val Phe Thr Val
 645 650 655

Val Pro Val Lys Glu Leu Val Asn Asp Ile Lys Phe Ala Pro Ile Gly
 660 665 670

Leu Ile Lys Met Phe Asn Ser Gly Gly Ala Val Lys Glu Met Asn His
 675 680 685

Gln Pro Gly Ser Ser Asn Val Ser Leu Lys Val Arg Gly Ser Gly Pro
 690 695 700

Phe Gly Ala Tyr Ser Ser Ser Lys Pro Lys Arg Val Ala Val Asp Ser
 705 710 715 720

Glu Glu Val Glu Phe Met Tyr Asp Glu Gly Gly Leu Ile Thr Ile Asp
 725 730 735

Leu Lys Val Pro Glu Lys Glu Leu Tyr Leu Trp Asp Ile Arg Ile Glu
 740 745 750

ES 2 708 843 T3

Leu

<210> 5
 <211> 772
 <212> PRT
 <213> *Cucumis melo*

5

<400> 5

```

Met Thr Val Thr Pro Lys Ile Ser Val Asn Asp Gly Asn Leu Val Val
1          5          10          15

His Gly Lys Thr Ile Leu Thr Gly Val Pro Asp Asn Ile Val Leu Thr
          20          25          30

Pro Gly Ser Gly Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala Phe Ile Gly Ala Thr
          35          40          45

Ala Ser Asn Ser Lys Ser Leu His Val Phe Pro Val Gly Val Leu Glu
50          55          60

Gly Thr Arg Phe Leu Cys Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr
65          70          75          80

Gln Arg Met Gly Thr Ser Gly Arg Asp Ile Pro Phe Glu Thr Gln Phe
          85          90          95

Leu Leu Met Glu Ser Lys Gly Asn Asp Gly Glu Asp Pro Asp Asn Ser
100         105         110

Ser Thr Ile Tyr Thr Val Phe Leu Pro Leu Leu Glu Gly Gln Phe Arg
115         120         125

Ala Ala Leu Gln Gly Asn Glu Lys Asn Glu Met Glu Ile Cys Leu Glu
130         135         140

Ser Gly Asp Asn Thr Val Glu Thr Asn Gln Gly Leu Ser Leu Val Tyr
145         150         155         160

Met His Ala Gly Thr Asn Pro Phe Glu Val Ile Thr Gln Ala Val Lys
165         170         175

Ala Val Glu Lys His Thr Gln Thr Phe Leu His Arg Glu Lys Lys Lys
180         185         190

Leu Pro Ser Phe Leu Asp Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe
195         200         205
    
```

10

ES 2 708 843 T3

Tyr Thr Asp Val Thr Ala Glu Gly Val Val Glu Gly Leu Lys Ser Leu
 210 215 220
 Ser Glu Gly Gly Ala Pro Pro Lys Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp
 225 230 235 240
 Gln Gln Ile Glu Ala Lys Pro Lys Asp Ala Asp Cys Val Val Gln Glu
 245 250 255
 Gly Ala Gln Phe Ala Ser Arg Leu Ser Gly Ile Lys Glu Asn His Lys
 260 265 270
 Phe Gln Lys Asn Gly Asn Asn Tyr Asp Gln Val Pro Gly Leu Lys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Asp Ala Lys Lys Gln His Lys Val Lys Phe Val Tyr Ala
 290 295 300
 Trp His Ala Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gly Val Lys Pro Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Gly Met Glu His Tyr Asp Ser Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln Ser Pro
 325 330 335
 Gly Met Leu Gly Asn Gln Pro Asp Ile Val Val Asp Ser Leu Ala Val
 340 345 350
 His Gly Ile Gly Leu Val His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe Tyr Asn
 355 360 365
 Glu Leu His Ser Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile Asp Gly Val Lys Val
 370 375 380
 Asp Val Gln Asn Ile Ile Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly Gly Arg
 385 390 395 400
 Val Thr Leu Thr Arg Ser Tyr His Gln Ala Leu Glu Ala Ser Ile Ala
 405 410 415
 Arg Asn Phe Ser Asp Asn Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His Asn Thr
 420 425 430
 Asp Ser Leu Tyr Ser Ala Lys Gln Thr Ala Val Val Arg Ala Ser Asp
 435 440 445
 Asp Tyr Tyr Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile His Ile Ser Ser
 450 455 460

ES 2 708 843 T3

Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro Asp Trp
465 470 475 480

Asp Met Phe His Ser Leu His Pro Thr Ala Glu Tyr His Gly Ala Ala
485 490 495

Arg Ala Ile Gly Gly Cys Ala Ile Tyr Val Ser Asp Lys Pro Gly Asn
500 505 510

His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Val
515 520 525

Leu Arg Ala Gln Leu Pro Gly Arg Pro Thr Arg Asp Ser Leu Phe Asn
530 535 540

Asp Pro Ala Arg Asp Gly Thr Ser Leu Leu Lys Ile Trp Asn Met Asn
545 550 555 560

Lys Cys Ser Gly Val Val Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Ala Gly Trp
565 570 575

Cys Arg Ile Thr Lys Lys Thr Arg Ile His Asp Glu Ser Pro Gly Thr
580 585 590

Leu Thr Thr Ser Val Arg Ala Ala Asp Val Asp Ala Ile Ser Gln Val
595 600 605

Ala Gly Ala Asp Trp Lys Gly Asp Thr Ile Val Tyr Ala Tyr Arg Ser
610 615 620

Gly Asp Leu Ile Arg Leu Pro Lys Gly Ala Ser Val Pro Val Thr Leu
625 630 635 640

Lys Val Leu Glu Tyr Asp Leu Leu His Ile Ser Pro Leu Lys Asp Ile
645 650 655

Ala Ser Asn Ile Ser Phe Ala Pro Ile Gly Leu Leu Asp Met Phe Asn
660 665 670

Thr Gly Gly Ala Val Glu Gln Val Asn Val Gln Val Val Glu Pro Ile
675 680 685

Pro Glu Phe Asp Gly Glu Val Ala Ser Glu Leu Thr Cys Ser Leu Pro
690 695 700

Asn Asp Arg Pro Pro Thr Ala Thr Ile Thr Met Lys Ala Arg Gly Cys

ES 2 708 843 T3

His Gly Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Ala Tyr His Gln Ala Leu Glu
 405 410 415

Ala Ser Ile Ala Arg Asn Phe Pro Asp Asn Gly Cys Ile Ser Cys Met
 420 425 430

Cys His Asn Thr Asp Gly Ile Tyr Ser Thr Lys Gln Thr Ala Val Val
 435 440 445

Arg Ala Ser Asp Asp Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile
 450 455 460

His Ile Ser Ser Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met
 465 470 475 480

Gln Pro Asp Trp Asp Met Phe His Ser Leu His Pro Ala Ala Asp Tyr
 485 490 495

His Ala Ala Ala Arg Ala Val Gly Gly Cys Pro Ile Tyr Val Ser Asp
 500 505 510

Lys Pro Gly Phe His Asn Phe Glu Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro
 515 520 525

Asp Gly Ser Val Leu Arg Ala Arg Leu Pro Gly Arg Pro Thr Arg Asp
 530 535 540

Cys Leu Phe Asn Asp Pro Ala Arg Asp Gly Thr Ser Leu Leu Lys Ile
 545 550 555 560

Trp Asn Lys Asn Asn Cys Ser Gly Val Val Gly Val Phe Asn Cys Gln
 565 570 575

Gly Ala Gly Trp Cys Lys Ile Glu Lys Lys Ile Arg Ile His Asp Thr
 580 585 590

Ser Pro Gly Thr Leu Thr Gly Ser Val Arg Ala Thr Asp Val Asp Ser
 595 600 605

Ile Ala Glu Val Ala Gly Gln Gly Trp Asn Gly Asp Val Val Val Tyr
 610 615 620

Leu Tyr Arg Ala Gly Glu Leu Val Cys Leu Pro Lys Gly Ala Ser Leu
 625 630 635 640

Pro Val Thr Leu Lys Val Arg Glu Tyr Glu Leu Phe His Phe Cys Pro
 645 650 655

ES 2 708 843 T3

Ile Lys Glu Ile Thr Ser Asn Ile Ser Phe Ala Pro Ile Gly Leu Leu
 660 665 670

Asp Met Phe Asn Gly Ser Gly Ala Val Asp Gln Phe Asp Val Gln Leu
 675 680 685

Thr Ser Glu Asn Arg Thr Glu Leu Ser Asp Gly Glu Lys Arg Ser Pro
 690 695 700

Ser Ala Ser Ile Gln Leu Lys Val Arg Gly Cys Gly Arg Phe Gly Ala
 705 710 715 720

Tyr Ser Ser Gln Cys Pro Leu Lys Cys Thr Val Gly Gly Ala Asp Ser
 725 730 735

Gly Phe Asn Tyr Asp Glu Glu Thr Cys Leu Leu Thr Leu Thr Leu Pro
 740 745 750

Val Pro Gln Glu Glu Met Tyr Arg Trp Pro Val Glu Ile Gln Val
 755 760 765

<210> 7
 <211> 772
 <212> PRT
 <213> *Cucumis sativus*

5

<400> 7

Met Thr Val Thr Pro Lys Ile Thr Val Asn Asp Gly Asn Leu Val Val
 1 5 10 15

His Gly Lys Thr Ile Leu Thr Gly Val Pro Asp Asn Ile Val Leu Thr
 20 25 30

Pro Gly Ser Gly Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala Phe Ile Gly Ala Thr
 35 40 45

Ala Ser Asn Ser Lys Ser Leu His Val Phe Pro Val Gly Val Leu Glu
 50 55 60

Gly Thr Arg Phe Leu Cys Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr
 65 70 75 80

Gln Arg Met Gly Thr Ser Gly Arg Asp Ile Pro Phe Glu Thr Gln Phe
 85 90 95

Leu Leu Met Glu Ser Gln Gly Asn Asp Gly Glu Asp Pro Asp Asn Ser
 100 105 110

10

ES 2 708 843 T3

Ser Thr Ile Tyr Thr Val Phe Leu Pro Leu Leu Glu Gly Gln Phe Arg
 115 120 125

Ala Ala Leu Gln Gly Asn Glu Lys Asn Glu Met Glu Ile Cys Leu Glu
 130 135 140

Ser Gly Asp Asn Thr Val Glu Thr Asn Gln Gly Leu Ser Leu Val Tyr
 145 150 155 160

Met His Ala Gly Thr Asn Pro Phe Glu Val Ile Thr Gln Ala Val Lys
 165 170 175

Ala Val Glu Lys His Thr Gln Thr Phe Leu His Arg Glu Lys Lys Lys
 180 185 190

Leu Pro Ser Phe Leu Asp Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe
 195 200 205

Tyr Thr Asp Val Thr Ala Glu Gly Val Val Glu Gly Leu Gln Ser Leu
 210 215 220

Ser Asp Gly Gly Ala Pro Pro Lys Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp
 225 230 235 240

Gln Gln Ile Glu Ala Lys Pro Lys Asp Ala Asp Cys Val Val Gln Glu
 245 250 255

Gly Ala Gln Phe Ala Ser Arg Leu Ser Gly Ile Lys Glu Asn His Lys
 260 265 270

Phe Gln Lys Asn Gly Asn Asn Tyr Asp Gln Val Pro Gly Leu Lys Val
 275 280 285

Val Val Asp Asp Ala Lys Lys Gln His Lys Val Lys Phe Val Tyr Ala
 290 295 300

Trp His Ala Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gly Val Lys Pro Ala Ser Pro
 305 310 315 320

Gly Met Glu His Tyr Asp Ser Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln Ser Pro
 325 330 335

Gly Met Leu Gly Asn Gln Pro Asp Ile Val Val Asp Ser Leu Ala Val
 340 345 350

His Gly Ile Gly Leu Val His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe Tyr Asn
 355 360 365

ES 2 708 843 T3

Glu Leu His Ser Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile Asp Gly Val Lys Val
 370 375 380
 Asp Val Gln Asn Ile Ile Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly Gly Arg
 385 390 395 400
 Val Thr Leu Thr Arg Ser Tyr His Gln Ala Leu Glu Ala Ser Ile Ala
 405 410 415
 Arg Asn Phe Ser Asp Asn Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His Asn Thr
 420 425 430
 Asp Ser Leu Tyr Ser Ala Lys Gln Thr Ala Val Val Arg Ala Ser Asp
 435 440 445
 Asp Tyr Tyr Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile His Ile Ser Ser
 450 455 460
 Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro Asp Trp
 465 470 475 480
 Asp Met Phe His Ser Leu His Pro Thr Ala Glu Tyr His Gly Ala Ala
 485 490 495
 Arg Ala Ile Gly Gly Cys Ala Ile Tyr Val Ser Asp Lys Pro Gly Asn
 500 505 510
 His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Val
 515 520 525
 Leu Arg Ala Gln Leu Pro Gly Arg Pro Thr Arg Asp Ser Leu Phe Asn
 530 535 540
 Asp Pro Ala Arg Asp Gly Thr Ser Leu Leu Lys Ile Trp Asn Met Asn
 545 550 555 560
 Lys Cys Ser Gly Val Val Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Ala Gly Trp
 565 570 575
 Cys Arg Ile Thr Lys Lys Thr Arg Ile His Asp Glu Ser Pro Gly Thr
 580 585 590
 Leu Thr Thr Ser Val Arg Ala Ala Asp Val Asp Ala Ile Ser Gln Val
 595 600 605
 Ala Gly Ala Asp Trp Lys Gly Asp Thr Ile Val Tyr Ala Tyr Arg Ser

ES 2 708 843 T3

610						615										620
Gly	Asp	Leu	Thr	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Leu	
625					630					635					640	
Lys	Val	Leu	Glu	Tyr	Asp	Leu	Phe	His	Ile	Ser	Pro	Leu	Lys	Asp	Ile	
			645						650					655		
Thr	Ser	Asn	Ile	Ser	Phe	Ala	Pro	Ile	Gly	Leu	Val	Asp	Met	Phe	Asn	
			660					665					670			
Ile	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Glu	Pro	Ile	
		675					680					685				
Pro	Glu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Cys	Ser	Leu	Pro	
	690					695					700					
Asp	Asp	Arg	Pro	Pro	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Met	Lys	Ala	Arg	Gly	Cys	
705					710					715					720	
Gly	Arg	Phe	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gln	Arg	Pro	Leu	Lys	Cys	Ser	Val	
				725					730						735	
Asp	Lys	Val	Gly	Thr	Asp	Phe	Val	Tyr	Asp	Asp	Val	Thr	Gly	Leu	Val	
			740					745					750			
Thr	Phe	Glu	Ile	Pro	Ile	Pro	Thr	Glu	Glu	Met	Tyr	Arg	Trp	Asn	Ile	
		755					760					765				
Glu	Ile	Glu	Val													
		770														

<210> 8
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*
 <400> 8

5

ES 2 708 843 T3

Pro Phe Glu Val Ile Thr Ser Ser Val Lys Ala Val Glu Arg His Leu
 1 5 10 15

Gln Thr Phe Ser His Arg Glu Lys Lys Lys Met Pro Asp Ile Leu Asn
 20 25 30

Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr Thr Asn Val Thr Ala
 35 40 45

Gln Gly Val Lys Gln Gly Leu Gln Ser Leu Glu Lys Gly Gly Val Ser
 50 55 60

Pro Arg Phe Val Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln Ser Val Ala Met Asp
 65 70 75 80

Pro Val Gly Ile Ala Cys Leu Ser Asp Asn Ser Ala Asn Phe Ala Asn
 85 90 95

Arg Leu Thr His Ile Arg Glu Asn His Lys Phe Gln Lys Asn Gly Arg
 100 105 110

Glu Gly His Arg Glu Asp Asp Pro Ala Lys Gly Leu Ala His Val Val
 115 120 125

Asn Glu Ile Lys Gly Lys His Gln Leu Lys Tyr Val Tyr Val Trp His
 130 135 140

Ala Ile Thr Gly Tyr Trp Gly Gly Val Arg Pro Gly Ala Ala Gly Met
 145 150 155 160

Glu His Tyr Gly Ser Lys Met Gln Arg Pro Val Pro Ser Pro Gly Val
 165 170 175

Pro Lys Asn Glu Arg Cys Glu Ala Leu Asp Ser Met Thr Ala Asn Gly
 180 185 190

Leu Gly Leu Val Asn Leu Asp Arg Ala Phe Ser Phe Tyr Asp Glu Leu
 195 200 205

His Ser Tyr
 210

<210> 9
 <211> 747
 <212> PRT
 <213> *Zea mays*

5

ES 2 708 843 T3

<400> 9

Met Thr Val Ala Ser Ser Val Arg Leu Ala Gly Gly Asn Leu Thr Val
1 5 10 15

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

Ser Ala Ala Thr Glu Gly Ala Val Asp Gly Ile Phe Leu Gly Ala Asp
35 40 45

Phe Ala Glu Pro Ala Ala Arg His Val Val Ser Leu Gly Asp Leu Arg

ES 2 708 843 T3

50					55					60					
Asp 65	Val	Arg	Phe	Met	Ala 70	Cys	Phe	Arg	Phe	Lys 75	Leu	Trp	Trp	Met	Ala 80
Gln	Arg	Met	Gly	Glu 85	Lys	Gly	Ser	Asp	Val 90	Pro	Arg	Glu	Thr	Gln 95	Phe
Leu	Leu	Val	Glu 100	Ser	Arg	Gly	Val	Gly 105	Asp	Glu	Asp	Ala	Ala 110	Tyr	Val
Val	Phe	Leu 115	Pro	Leu	Val	Glu	Gly 120	Ala	Phe	Arg	Ala	Ser 125	Ile	Gln	Gly
Gly	Ala 130	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu 135	Leu	Cys	Val	Glu	Ser 140	Gly	Asp	Asp	Asp
Thr 145	Arg	Ala	Ala	Ser	Phe 150	Glu	Arg	Ser	Leu	Phe 155	Val	Gly	Ala	Ala	Glu 160
Ser	Asp	Pro	Phe	Ala 165	Ala	Ile	Ser	Gly	Ala 170	Val	Ala	Ala	Ala	Lys 175	Ser
Ala	Leu	Arg	Thr 180	Phe	Arg	Val	Arg	Ala 185	Glu	Lys	Lys	Leu	Pro 190	Gly	Ile
Val	Asp	Tyr 195	Phe	Gly	Trp	Cys	Thr 200	Trp	Asp	Ala	Phe	Tyr 205	Gln	Asp	Val
Thr 210	Gln	Glu	Gly	Val	Glu	Ala 215	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu 220	Ile	Ala	Gly	Gly
Ala 225	Pro	Pro	Lys	Phe	Val 230	Ile	Ile	Asp	Asp	Gly 235	Trp	Gln	Ser	Val	Ala 240
Thr	Asp	Thr	Asn	Glu 245	Ser	Ala	Gly	Glu	Asp 250	Lys	Pro	Pro	Leu	Leu 255	Ser
Arg	Leu	Thr	Gly 260	Ile	Lys	Glu	Asn 265	Ser	Lys	Phe	Gln	Asn 270	Ala	Asp	Asp
Pro	Ala	Ala	Gly	Ile	Lys	Thr	Val 280	Val	Arg	Leu	Ala	Lys 285	Glu	Glu	Tyr
Arg	Leu 290	Lys	Tyr	Val	Tyr	Val 295	Trp	His	Ala	Ile	Thr 300	Gly	Tyr	Trp	Gly

ES 2 708 843 T3

Gly Val Arg Pro Gly Glu Glu His Tyr Arg Ser Ser Met Gln Phe Pro
 305 310 315 320

Lys Val Ser Pro Gly Val Met Glu Asn Glu Pro Gly Met Lys Thr Asp
 325 330 335

Val Leu Thr Val Gln Gly Leu Gly Leu Val His Pro Arg Ala Val Tyr
 340 345 350

Arg Phe Tyr Asp Glu Leu His Ala Tyr Leu Ala Ala Ala Gly Val Asp
 355 360 365

Gly Val Lys Val Asp Val Gln Cys Ile Leu Glu Thr Leu Gly Ala Gly
 370 375 380

His Gly Gly Arg Val Gln Leu Thr Arg Gln Tyr His Gln Ala Leu Asp
 385 390 395 400

Ala Ser Val Ala Lys Asn Phe Pro Glu Asn Gly Ile Ile Ala Cys Met
 405 410 415

Ser His Asn Thr Asp Ala Leu Tyr Cys Ser Lys Gln Thr Ala Val Val
 420 425 430

Arg Ala Ser Asp Asp Phe Cys Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile
 435 440 445

His Ile Ala Ser Val Ala Tyr Asn Ser Val Phe Leu Gly Glu Phe Met
 450 455 460

Leu Pro Asp Trp Asp Met Phe His Ser Leu His Gln Ala Gly Asp Tyr
 465 470 475 480

His Gly Ser Ala Arg Ala Ile Ser Gly Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
 485 490 495

Ala Pro Gly Lys His Asn Phe Glu Leu Leu Lys Lys Ile Val Leu Pro
 500 505 510

Asp Gly Ser Ile Leu Arg Ala Arg Leu Pro Gly Arg Pro Thr Lys Asp
 515 520 525

Cys Leu Phe Thr Asp Pro Ala Arg Asp Gly Val Ser Leu Leu Lys Ile
 530 535 540

Trp Asn Met Asn Lys Phe Thr Gly Val Leu Gly Val Tyr Asn Cys Gln
 545 550 555 560

ES 2 708 843 T3

Gly Ala Ala Trp Asn Ser Val Glu Lys Lys Asn Thr Phe His Gln Thr
565 570 575

Gly Thr Glu Ala Leu Thr Cys Gly Val Lys Gly Gly Asp Val His Leu
580 585 590

Ile Ser Glu Ala Ala Thr Asp Thr Glu Trp Asp Gly Asp Cys Ala Met
595 600 605

Tyr Arg His Ala Asp Gly Asp Leu Val Val Leu Pro His Asp Ala Ala
610 615 620

Leu Pro Val Ser Leu Lys Val Leu Glu His Asp Ile Leu Thr Val Ser
625 630 635 640

Pro Ile Lys Glu Leu Ala Pro Gly Phe Arg Phe Ala Pro Ile Gly Leu
645 650 655

Val Asp Met Phe Asn Ser Gly Gly Ala Val Glu Gly Leu Thr Tyr His
660 665 670

Leu Leu Gly Gly Asp Gly Ser Thr Leu Gly Ser Glu Ala Val Ala Leu
675 680 685

Ala Cys Met Glu Val Lys Gly Cys Gly Arg Phe Gly Ala Tyr Ser Ser
690 695 700

Val Arg Pro Arg Lys Ser Thr Leu Gly Ser Ala Gln Ile Glu Leu Lys
705 710 715 720

Tyr Asp Ser Ser Ser Gly Leu Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ala Met Pro
725 730 735

Lys Glu Arg Val His Lys Ile Val Ile Glu Leu
740 745

<210> 10
<211> 753
<212> PRT
<213> *Oryza sativa*

<400> 10

Met Thr Val Gly Ala Gly Val Ala Val Gln Asp Gly Gly Leu Val Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Thr Val Leu Thr Glu Val Arg Asp Asn Val Leu Leu Thr
20 25 30

5

10

ES 2 708 843 T3

Pro Ala Ala Gly Ala Gly Met Thr Ser Gly Thr Phe Val Gly Val Arg
35 40 45

Ser Ala Thr Ala Gly Ser Arg Ser Val Phe Pro Val Gly Lys Leu Arg
50 55 60

Gly Leu Arg Phe Ile Cys Thr Phe Arg Phe Lys Met Trp Trp Met Thr
65 70 75 80

Gln Arg Met Gly Thr Ser Gly Arg Asp Ile Pro Phe Glu Thr Gln Phe
85 90 95

Leu Leu Val Glu Ala Ala Asp Ala Asp Gly Ser His Leu Ala Gly Asp
100 105 110

Gly Ala Ala Ala Val Tyr Thr Val Phe Leu Pro Ile Leu Glu Gly Pro
115 120 125

Phe Arg Ala Val Leu Gln Gly Asn Ser Asp Asp Glu Leu Glu Ile Cys
130 135 140

Leu Glu Ser Gly Asp Pro Ala Val Glu Ser Phe Glu Gly Thr His Leu
145 150 155 160

Val Phe Val Gly Ala Gly Ser Asp Pro Phe Glu Val Ile Thr Asn Ser
165 170 175

Val Lys Ala Val Glu Arg His Leu Gln Thr Phe Thr His Arg Glu Lys
180 185 190

Lys Lys Met Pro Asp Met Leu Asn Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp
195 200 205

Ala Phe Tyr Thr Asp Val Thr Ser Glu Gly Val Met Glu Gly Leu Gln
210 215 220

Ser Leu Gly Lys Gly Gly Thr Gly Pro Lys Phe Val Ile Ile Asp Asp
225 230 235 240

Gly Trp Gln Ser Val Ser Met Asp Pro Ala Gly Ile Ala Ser Leu Ala
245 250 255

Asp Asn Ser Ala Asn Phe Ala Asn Arg Leu Thr His Ile Lys Glu Asn
260 265 270

His Lys Phe Gln Leu Asn Gly Arg Lys Gly His Arg Glu Glu Asn Pro
275 280 285

ES 2 708 843 T3

Ala Asn Gly Leu Ala His Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Lys His Gln
 290 295 300

Leu Lys Tyr Val Tyr Val Trp His Ala Ile Thr Gly Tyr Trp Gly Gly
 305 310 315 320

Val Arg Pro Gly Ala Asp Gly Met Glu His Tyr Glu Ser Lys Met Gln
 325 330 335

Tyr Pro Val Ser Ser Pro Gly Val Gln Lys Asn Glu Pro Cys Asp Ala
 340 345 350

Leu Asn Ser Ile Thr Thr Asn Gly Leu Gly Leu Val Asn Pro Asp Arg
 355 360 365

Val Phe Ser Phe Tyr Asn Glu Leu His Ala Tyr Leu Ala Ser Ala Gly
 370 375 380

Ile Asp Gly Val Lys Val Asp Val Gln Asn Ile Leu Glu Thr Leu Gly
 385 390 395 400

Ala Gly His Gly Gly Arg Val Leu Leu Ala Arg Lys Tyr His Gln Ala
 405 410 415

Leu Glu Ala Ser Ile Ala Arg Asn Phe Arg Asp Asn Gly Ile Ile Cys
 420 425 430

Cys Met Ser His Asn Thr Asp Asn Leu Tyr Ser Ser Lys Arg Ser Ala
 435 440 445

Val Val Arg Ala Ser Asp Asp Phe Trp Pro Arg Asp Pro Ala Ser His
 450 455 460

Thr Ile His Ile Ala Ser Val Ala Tyr Asn Thr Val Phe Leu Gly Glu
 465 470 475 480

Phe Met Gln Pro Asp Trp Asp Met Phe His Ser Val His Pro Met Ala
 485 490 495

Glu Tyr His Ala Ala Ala Arg Ala Val Gly Gly Cys Ala Ile Tyr Val
 500 505 510

Ser Asp Lys Pro Gly Asn His Asp Phe Asn Leu Leu Lys Lys Leu Val
 515 520 525

Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg Ala Lys Leu Pro Gly Arg Pro Thr

ES 2 708 843 T3

<400> 11

Met Thr Val Thr Pro Lys Ile Ser Val Asn Asp Gly Asn Leu Val Val
 1 5 10 15

His Gly Lys Thr Ile Leu Lys Gly Val Pro Glu Asn Val Val Leu Thr
 20 25 30

Pro Gly Ser Gly Asn Gly Leu Leu Thr Gly Gly Ala Phe Ile Gly Ala
 35 40 45

Thr Ala Ser Asn Ser Lys Ser Leu His Val Phe Pro Ile Gly Ile Leu
 50 55 60

Glu Gly Leu Arg Phe Val Cys Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met
 65 70 75 80

Thr Gln Arg Met Gly Thr Cys Gly Arg Asp Ile Pro Leu Glu Thr Gln
 85 90 95

Phe Met Leu Ile Glu Ser Lys Asp Ser Glu Gly Glu Glu Gly Asn Ser
 100 105 110

Pro Val Ile Tyr Thr Val Leu Leu Pro Leu Leu Glu Gly Pro Phe Arg
 115 120 125

Ser Val Leu Gln Gly Asn Glu Lys Ser Glu Ile Glu Ile Cys Phe Glu
 130 135 140

Ser Gly Asp His Ala Val Glu Thr Asn Gln Gly Leu His Met Val Tyr
 145 150 155 160

Met His Ala Gly Thr Asn Pro Phe Glu Val Ile Asn Gln Ala Val Lys
 165 170 175

Ala Val Glu Lys His Met Gln Thr Phe His His Arg Glu Lys Lys Arg
 180 185 190

Leu Pro Ser Phe Leu Asp Met Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe
 195 200 205

Tyr Thr Asp Val Thr Ala Glu Gly Val Glu Gln Gly Leu Lys Ser Leu
 210 215 220

Ser Glu Gly Gly Thr Pro Pro Arg Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp
 225 230 235 240

ES 2 708 843 T3

Gln Gln Ile Glu Ser Lys Ala Lys Asp Pro Gly Cys Val Val Gln Glu
 245 250 255

Gly Ala Gln Phe Ala Thr Met Leu Thr Gly Ile Lys Glu Asn Ala Lys
 260 265 270

Phe Gln Lys Asn Lys Asn Glu Glu His Ser Glu Pro Thr Ser Gly Leu
 275 280 285

Lys His Leu Val Asp Gly Val Lys Lys His His Asn Val Lys Asn Val
 290 295 300

Tyr Val Trp His Ala Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gly Val Lys Pro Ala
 305 310 315 320

Ala Thr Gly Met Glu His Tyr Asp Thr Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln
 325 330 335

Ser Pro Gly Val Leu Gly Asn Gln Pro Asp Ile Val Met Asp Ser Leu
 340 345 350

Ser Val His Gly Leu Gly Leu Val His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe
 355 360 365

Tyr Asn Glu Leu His Ala Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Val Asp Gly Val
 370 375 380

Lys Val Asp Val Gln Asn Ile Ile Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly
 385 390 395 400

Gly Arg Val Ser Leu Thr Arg Ser Tyr His His Ala Leu Glu Ala Ser
 405 410 415

Ile Ala Arg Asn Phe Ser Asp Asn Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His
 420 425 430

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

Ser Asp Asp Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile His Ile
 450 455 460

Ser Ser Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro
 465 470 475 480

Asp Trp Asp Met Phe His Ser Leu His Pro Ala Ala Glu Tyr His Ala
 485 490 495

ES 2 708 843 T3

Ala Ala Arg Ala Ile Gly Gly Cys Pro Ile Tyr Val Ser Asp Lys Pro
500 505 510

Gly Asn His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Ser Asp Gly
515 520 525

Ser Val Leu Arg Ala Gln Leu Pro Gly Arg Pro Thr Arg Asp Ser Leu
530 535 540

Phe Val Asp Pro Ala Arg Asp Arg Thr Ser Leu Leu Lys Ile Trp Asn
545 550 555 560

Met Asn Lys Cys Thr Gly Val Val Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Ala
565 570 575

Gly Trp Cys Lys Val Glu Lys Lys Thr Arg Ile His Asp Ile Ser Pro
580 585 590

Gly Thr Leu Thr Ser Ser Val Cys Ala Ser Asp Val Asp Leu Ile Thr
595 600 605

Gln Val Ala Gly Ala Glu Trp His Gly Glu Thr Ile Val Tyr Ala Tyr
610 615 620

Arg Ser Gly Glu Val Ile Arg Leu Pro Lys Gly Val Ser Ile Pro Val
625 630 635 640

Thr Leu Lys Val Leu Glu Phe Glu Leu Phe His Phe Cys Pro Ile Gln
645 650 655

Glu Ile Ser Ser Ser Ile Ser Phe Ala Thr Ile Gly Leu Met Asp Met
660 665 670

Phe Asn Thr Gly Gly Ala Val Glu Glu Val Glu Ile His Arg Glu Thr
675 680 685

Asp Asn Lys Gln Glu Leu Phe Glu Gly Glu Ala Val Ser Ser Glu Leu
690 695 700

Ile Thr Ser Leu Gly Pro Asn Arg Thr Thr Thr Ala Thr Ile Thr Leu
705 710 715 720

Lys Val Arg Gly Ser Gly Lys Phe Gly Val Tyr Ser Ser Gln Arg Pro
725 730 735

Ile Lys Cys Met Val Asp Gly Thr Glu Thr Asp Phe Asn Tyr Asp Ser
740 745 750

ES 2 708 843 T3

Glu Thr Gly Leu Thr Thr Phe Ile Ile Pro Val Pro Gln Glu Glu Leu
 755 760 765

Tyr Lys Trp Leu Ile Glu Ile Gln Val
 770 775

5

- <210> 12
- <211> 753
- <212> PRT
- <213> *Cucumis sativus*
- <400> 12

Met Thr Val Gly Ala Gly Ile Thr Ile Ser Asp Ala Asn Leu Thr Val
 1 5 10 15

Leu Gly Asn Arg Val Leu Ser Asp Val His Asn Asn Ile Thr Leu Thr
 20 25 30

Ala Ala Pro Gly Gly Gly Val Met Asn Gly Ala Phe Ile Gly Val Gln
 35 40 45

Ser Asp Gln Ile Gly Ser Arg Arg Val Phe Pro Ile Gly Lys Leu Ile
 50 55 60

Gly Leu Arg Phe Leu Cys Ala Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr
 65 70 75 80

Gln Arg Met Gly Cys Ser Gly Gln Glu Ile Pro Phe Glu Thr Gln Phe
 85 90 95

Leu Val Val Glu Thr Arg Asp Gly Ser Asn Ile Ala Gly Asn Gly Glu
 100 105 110

Glu Gly Asp Ala Val Tyr Thr Val Phe Leu Pro Ile Leu Glu Gly Asp
 115 120 125

Phe Arg Ala Val Leu Gln Gly Asn Asp Asn Asn Glu Leu Glu Ile Cys
 130 135 140

Leu Glu Ser Gly Asp Pro Ser Val Asp Gly Phe Glu Gly Ser His Leu
 145 150 155 160

Val Phe Val Gly Ala Gly Ser Asp Pro Phe Glu Thr Ile Thr Tyr Ala
 165 170 175

Val Lys Ser Val Glu Lys His Leu Gln Thr Phe Ala His Arg Glu Arg
 180 185 190

10

ES 2 708 843 T3

Lys Lys Met Pro Asp Ile Leu Asn Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp
 195 200 205
 Ala Phe Tyr Thr Asp Val Thr Ser Asp Gly Val Lys Lys Gly Leu Glu
 210 215 220
 Ser Phe Glu Asn Gly Gly Ile Pro Pro Lys Phe Val Ile Ile Asp Asp
 225 230 235 240
 Gly Trp Gln Ser Val Ala Lys Asp Ala Ala Ser Thr Asp Cys Lys Ala
 245 250 255
 Asp Asn Thr Ala Asn Phe Ala Asn Arg Leu Thr His Ile Lys Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Phe Gln Lys Asp Gly Lys Glu Gly Glu Arg Ile Glu Asn Pro
 275 280 285
 Ala Leu Gly Leu Gln His Ile Val Ser Tyr Met Lys Glu Lys His Ala
 290 295 300
 Thr Lys Tyr Val Tyr Val Trp His Ala Ile Thr Gly Tyr Trp Gly Gly
 305 310 315 320
 Val Ser Ser Gly Val Lys Glu Met Glu Gln Tyr Glu Ser Lys Ile Ala
 325 330 335
 Tyr Pro Val Ala Ser Pro Gly Val Glu Ser Asn Glu Pro Cys Asp Ala
 340 345 350
 Leu Asn Ser Ile Ser Lys Thr Gly Leu Gly Leu Val Asn Pro Glu Lys
 355 360 365
 Val Phe Asn Phe Tyr Asn Glu Gln His Ser Tyr Leu Ala Ser Ala Gly
 370 375 380
 Val Asp Gly Val Lys Val Asp Val Gln Asn Ile Leu Glu Thr Leu Gly
 385 390 395 400
 Ala Gly His Gly Gly Arg Val Lys Leu Ala Arg Lys Tyr His Gln Ala
 405 410 415
 Leu Glu Ala Ser Ile Ser Arg Asn Phe Gln Asp Asn Gly Ile Ile Ser
 420 425 430
 Cys Met Ser His Asn Thr Asp Gly Leu Tyr Ser Ser Lys Arg Asn Ala

ES 2 708 843 T3

435					440					445					
Val	Ile	Arg	Ala	Ser	Asp	Asp	Phe	Trp	Pro	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser	His
450					455					460					
Thr	Ile	His	Ile	Ala	Ser	Val	Ala	Tyr	Asn	Ser	Leu	Phe	Leu	Gly	Glu
465					470					475					480
Phe	Met	Gln	Pro	Asp	Trp	Asp	Met	Phe	His	Ser	Leu	His	Pro	Met	Ala
				485					490					495	
Glu	Tyr	His	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Gly	Gly	Cys	Ala	Ile	Tyr	Val
			500					505					510		
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Gln	His	Asp	Phe	Asn	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	Val
		515					520					525			
Leu	His	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr
	530					535					540				
Lys	Asp	Cys	Leu	Phe	Ala	Asp	Pro	Ala	Arg	Asp	Gly	Lys	Ser	Leu	Leu
545					550					555					560
Lys	Ile	Trp	Asn	Met	Asn	Asp	Leu	Ser	Gly	Val	Val	Gly	Val	Phe	Asn
				565					570					575	
Cys	Gln	Gly	Ala	Gly	Trp	Cys	Lys	Val	Gly	Lys	Lys	Asn	Leu	Ile	His
			580					585					590		
Asp	Glu	Asn	Pro	Asp	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Ile	Arg	Ala	Lys	Asp	Val
		595					600					605			
Ser	Tyr	Leu	Trp	Lys	Ile	Ala	Gly	Glu	Ser	Trp	Thr	Gly	Asp	Ala	Val
	610					615					620				
Ile	Phe	Ser	His	Leu	Ala	Gly	Glu	Val	Val	Tyr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala
625					630					635					640
Ser	Met	Pro	Ile	Thr	Leu	Lys	Ser	Arg	Glu	Phe	Asp	Val	Phe	Thr	Val
				645					650					655	
Val	Pro	Val	Lys	Glu	Leu	Ala	Asn	Asp	Ile	Lys	Phe	Ala	Pro	Ile	Gly
			660					665					670		
Leu	Met	Lys	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Val	Lys	Glu	Met	Asn	His
		675					680					685			

ES 2 708 843 T3

Gln Pro Gly Ser Ser Asn Val Ser Leu Lys Val Arg Gly Ser Gly Pro
 690 695 700

Phe Gly Ala Tyr Ser Ser Ser Lys Pro Lys Arg Val Ala Val Asp Ser
 705 710 715 720

Glu Glu Val Glu Phe Ile Tyr Asp Glu Gly Gly Leu Ile Thr Ile Asp
 725 730 735

Leu Lys Val Pro Glu Lys Glu Leu Tyr Leu Trp Asp Ile Arg Ile Glu
 740 745 750

Leu

<210> 13
 <211> 772
 <212> PRT
 <213> *Cucumis melo*

5

<400> 13

Met Thr Val Thr Pro Lys Ile Ser Val Asn Asp Gly Asn Leu Val Val
 1 5 10 15

His Gly Lys Thr Ile Leu Thr Gly Val Pro Asp Asn Ile Val Leu Thr
 20 25 30

Pro Gly Ser Gly Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala Phe Ile Gly Ala Thr
 35 40 45

Ala Ser Asn Ser Lys Ser Leu His Val Phe Pro Val Gly Val Leu Glu
 50 55 60

Gly Thr Arg Phe Leu Cys Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr
 65 70 75 80

Gln Arg Met Gly Thr Ser Gly Arg Asp Ile Pro Phe Glu Thr Gln Phe
 85 90 95

Leu Leu Met Glu Ser Lys Gly Asn Asp Gly Glu Asp Pro Asp Asn Ser
 100 105 110

Ser Thr Ile Tyr Thr Val Phe Leu Pro Leu Leu Glu Gly Gln Phe Arg
 115 120 125

Ala Ala Leu Gln Gly Asn Glu Lys Asn Glu Met Glu Ile Cys Leu Glu
 130 135 140

10

ES 2 708 843 T3

Ser Gly Asp Asn Thr Val Glu Thr Asn Gln Gly Leu Ser Leu Val Tyr
145 150 155 160

Met His Ala Gly Thr Asn Pro Phe Glu Val Ile Thr Gln Ala Val Lys
165 170 175

Ala Val Glu Lys His Thr Gln Thr Phe Leu His Arg Glu Lys Lys Lys
180 185 190

Leu Pro Ser Phe Leu Asp Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe
195 200 205

Tyr Thr Asp Ala Thr Ala Glu Gly Val Val Glu Gly Leu Lys Ser Leu
210 215 220

Ser Glu Gly Gly Ala Pro Pro Lys Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp
225 230 235 240

Gln Gln Ile Glu Ala Lys Pro Lys Asp Ala Asp Cys Val Val Gln Glu
245 250 255

Gly Ala Gln Phe Ala Ser Arg Leu Ser Gly Ile Lys Glu Asn His Lys
260 265 270

Phe Gln Lys Asn Gly Asn Asn Tyr Asp Gln Val Pro Gly Leu Lys Val
275 280 285

Val Val Asp Asp Ala Lys Lys Gln His Lys Val Lys Phe Val Tyr Ala
290 295 300

Trp His Ala Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gly Val Lys Pro Ala Ser Pro
305 310 315 320

Gly Met Glu His Tyr Asp Ser Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln Ser Pro
325 330 335

Gly Met Leu Gly Asn Gln Pro Asp Ile Val Val Asp Ser Leu Ala Val
340 345 350

His Gly Ile Gly Leu Val His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe Tyr Asn
355 360 365

Glu Leu His Ser Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile Asp Gly Val Lys Val
370 375 380

Asp Val Gln Asn Ile Ile Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly Gly Arg
385 390 395 400

ES 2 708 843 T3

Val Thr Leu Thr Arg Ser Tyr His Gln Ala Leu Glu Ala Ser Ile Ala
405 410 415

Arg Asn Phe Ser Asp Asn Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His Asn Thr
420 425 430

Asp Ser Leu Tyr Ser Ala Lys Gln Thr Ala Val Val Arg Ala Ser Asp
435 440 445

Asp Tyr Tyr Pro Arg Asp Pro Thr Ser His Thr Ile His Ile Ser Ser
450 455 460

Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro Asp Trp
465 470 475 480

Asp Met Phe His Ser Leu His Pro Thr Ala Glu Tyr His Gly Ala Ala
485 490 495

Arg Ala Ile Gly Gly Cys Ala Ile Tyr Val Ser Asp Lys Pro Gly Asn
500 505 510

His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Val
515 520 525

Leu Arg Ala Gln Leu Pro Gly Arg Pro Thr Arg Asp Ser Leu Phe Asn
530 535 540

Asp Pro Ala Arg Asp Gly Ile Ser Leu Leu Lys Ile Trp Asn Met Asn
545 550 555 560

Lys Cys Ser Gly Val Val Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Ala Gly Trp
565 570 575

Cys Arg Ile Thr Lys Lys Thr Arg Ile His Asp Glu Ser Pro Gly Thr
580 585 590

Leu Thr Thr Ser Val Arg Ala Ala Asp Val Asp Ala Ile Ser Gln Val
595 600 605

Ala Gly Ala Asp Trp Lys Gly Asp Thr Ile Val Tyr Ala Tyr Arg Ser
610 615 620

Gly Asp Leu Ile Arg Leu Pro Lys Gly Ala Ser Val Pro Val Thr Leu
625 630 635 640

Lys Val Leu Glu Tyr Asp Leu Leu His Ile Ser Pro Leu Lys Asp Ile
645 650 655

ES 2 708 843 T3

Ala Ser Asn Ile Ser Phe Ala Pro Ile Gly Leu Leu Asp Met Phe Asn
 660 665 670

Thr Gly Gly Ala Val Glu Gln Val Asn Val Gln Val Val Glu Pro Ile
 675 680 685

Pro Glu Phe Asp Gly Glu Val Ala Ser Glu Leu Thr Cys Ser Leu Pro
 690 695 700

Asn Asp Arg Pro Pro Thr Ala Thr Ile Thr Met Lys Ala Arg Gly Cys
 705 710 715 720

Arg Arg Phe Gly Leu Tyr Ser Ser Gln Arg Pro Leu Lys Cys Ser Val
 725 730 735

Asp Lys Val Asp Val Asp Phe Val Tyr Asp Glu Val Thr Gly Leu Val
 740 745 750

Thr Phe Glu Ile Pro Ile Pro Thr Glu Glu Met Tyr Arg Trp Asp Ile
 755 760 765

Glu Ile Gln Val
 770

<210> 14
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> *Coffea arabica*

5

<400> 14

Met Val Lys Ser Pro Gly Thr Glu Asp Tyr Thr Arg Arg Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Asn Gly Leu Gly Leu Thr Pro Pro Met Gly Trp Asn Ser Trp Asn
 20 25 30

His Phe Arg Cys Asn Leu Asp Glu Lys Leu Ile Arg Glu Thr Ala Asp
 35 40 45

Ala Met Val Ser Lys Gly Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Tyr Ile Asn
 50 55 60

Leu Asp Asp Cys Trp Ala Glu Leu Asn Arg Asp Ser Gln Gly Asn Leu
 65 70 75 80

Val Pro Lys Gly Ser Thr Phe Pro Ser Gly Ile Lys Ala Leu Ala Asp
 85 90 95

10

ES 2 708 843 T3

Tyr Val His Ser Lys Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ser Asp Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Thr Cys Ser Lys Thr Met Pro Gly Ser Leu Gly His Glu Glu
 115 120 125

Gln Asp Ala Lys Thr Phe Ala Ser Trp Gly Val Asp Tyr Leu Lys Tyr
 130 135 140

Asp Asn Cys Asn Asn Asn Asn Ile Ser Pro Lys Glu Arg Tyr Pro Ile
 145 150 155 160

Met Ser Lys Ala Leu Leu Asn Ser Gly Arg Ser Ile Phe Phe Ser Leu
 165 170 175

Cys Glu Trp Gly Glu Glu Asp Pro Ala Thr Trp Ala Lys Glu Val Gly
 180 185 190

Asn Ser Trp Arg Thr Thr Gly Asp Ile Asp Asp Ser Trp Ser Ser Met
 195 200 205

Thr Ser Arg Ala Asp Met Asn Asp Lys Trp Ala Ser Tyr Ala Gly Pro
 210 215 220

Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Glu Val Gly Asn Gly Gly Met
 225 230 235 240

Thr Thr Thr Glu Tyr Arg Ser His Phe Ser Ile Trp Ala Leu Ala Lys
 245 250 255

Ala Pro Leu Leu Ile Gly Cys Asp Ile Arg Ser Met Asp Gly Ala Thr
 260 265 270

Phe Gln Leu Leu Ser Asn Ala Glu Val Ile Ala Val Asn Gln Asp Lys
 275 280 285

Leu Gly Val Gln Gly Asn Lys Val Lys Thr Tyr Gly Asp Leu Glu Val
 290 295 300

Trp Ala Gly Pro Leu Ser Gly Lys Arg Val Ala Val Ala Leu Trp Asn
 305 310 315 320

Arg Gly Ser Ser Thr Ala Thr Ile Thr Ala Tyr Trp Ser Asp Val Gly
 325 330 335

Leu Pro Ser Thr Ala Val Val Asn Ala Arg Asp Leu Trp Ala His Ser

ES 2 708 843 T3

340

345

350

Thr Glu Lys Ser Val Lys Gly Gln Ile Ser Ala Ala Val Asp Ala His
355 360 365

Asp Ser Lys Met Tyr Val Leu Thr Pro Gln
370 375

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una estructura de proteína multimérica que comprende al menos dos monómeros de α -galactosidasa que están unidos de forma covalente entre sí a través de un radical de unión, en donde dicho radical de unión no está presente en la α -galactosidasa nativa, comprendiendo el proceso hacer reaccionar la α -galactosidasa con un agente de reticulación que comprende dicho radical de unión y al menos dos grupos reactivos.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha reacción se efectúa en condiciones en las que la α -galactosidasa nativa está en una forma dimérica.
3. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde cada uno de dichos grupos reactivos es capaz de formar un enlace covalente entre dicho radical de unión y al menos un monómero de α -galactosidasa.
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cada uno de dichos grupos reactivos comprende un grupo saliente.
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho radical de unión comprende un poli(alquilenglicol).
6. El proceso de la reivindicación 5, en donde dichos al menos dos grupos reactivos son grupos terminales de dicho poli(alquilenglicol).
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha α -galactosidasa que reacciona con dicho agente de reticulación da como resultado al menos un radical de unión que tiene una fórmula general:
- $$X_1-(CR_1R_2-CR_3R_4-Y)_n-X_2-$$
- en donde cada uno de X_1 y X_2 es un grupo funcional que forma un enlace covalente con al menos un monómero de α -galactosidasa, formándose cada uno de dicho grupo funcional tras la reacción de uno de dichos grupos reactivos con dicho al menos un monómero de α -galactosidasa;
 Y es O, S o NR_5 ;
 n es un número entero de 1 a 200; y
 cada uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, alcoxí, hidroxí, oxo, tiol y tioalcoxí.
8. El proceso de la reivindicación 7, en donde n es al menos 5.
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho radical de unión tiene una longitud de al menos 30 átomos.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho grupo reactivo reacciona con un grupo amina para formar un enlace amida.
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha α -galactosidasa es una α -galactosidasa humana.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha α -galactosidasa es una α -galactosidasa recombinante vegetal.
13. Una estructura de proteína multimérica que comprende al menos dos monómeros de α -galactosidasa que están unidos de forma covalente entre sí a través de un radical de unión, que se prepara de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la estructura de proteína multimérica presenta una característica seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una actividad de α -galactosidasa, después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones plasmáticas humanas durante una hora, que es al menos un 10 % mayor que una actividad de α -galactosidasa nativa después de someter dicha α -galactosidasa nativa a dichas condiciones plasmáticas humanas durante una hora;
- (b) una actividad de α -galactosidasa que disminuye después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones plasmáticas humanas durante una hora en un porcentaje que es al menos un 10 % menor que el porcentaje que disminuye una actividad de dicha α -galactosidasa nativa después de someter dicha α -galactosidasa nativa a dichas condiciones plasmáticas humanas durante una hora; y
- (c) una actividad de α -galactosidasa que permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones plasmáticas humanas durante una hora.

14. La estructura de proteína multimérica de la reivindicación 13, que presenta una actividad α -galactosidasa que permanece sustancialmente sin cambios después de someter la estructura de proteína multimérica a condiciones lisosómicas durante una semana.
- 5
15. La estructura de proteína multimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

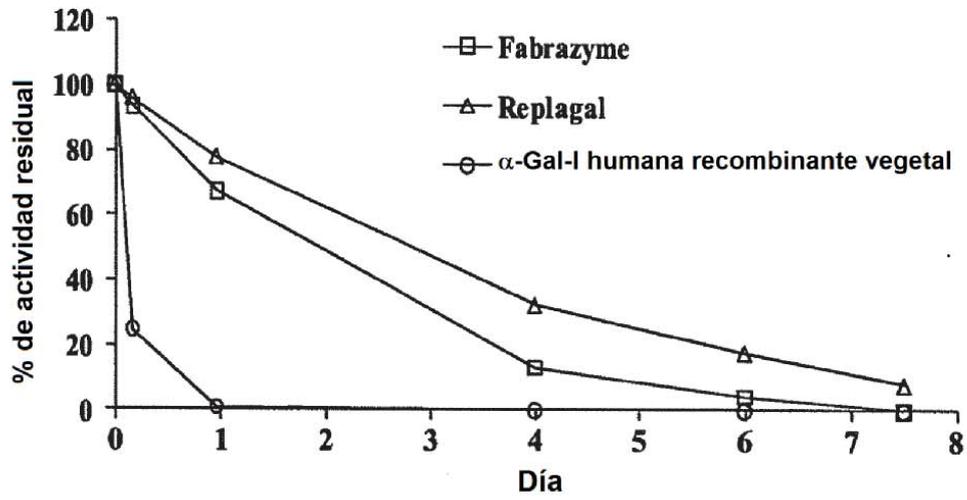


FIG. 1

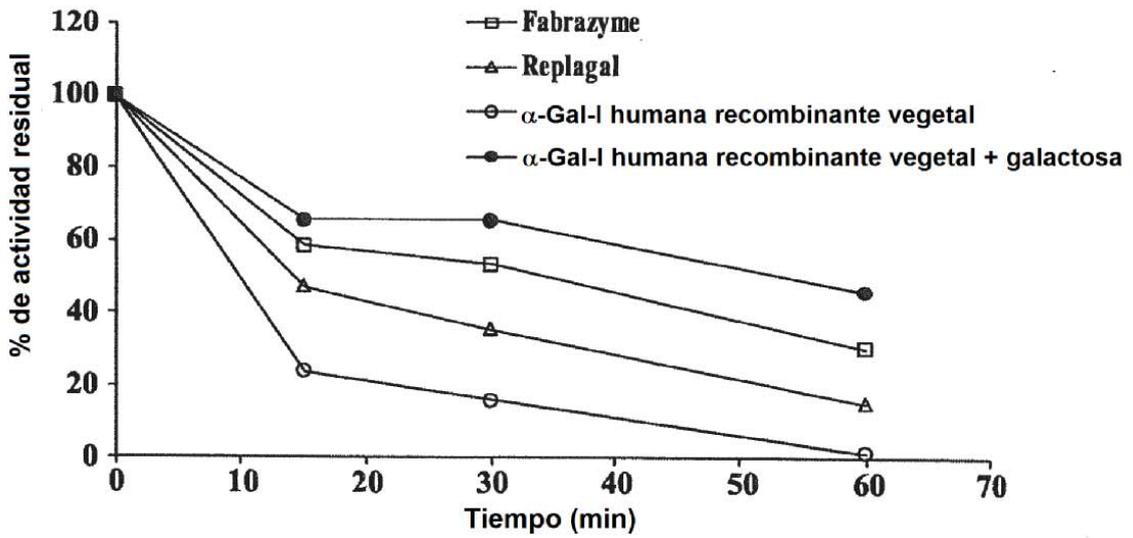


FIG. 2

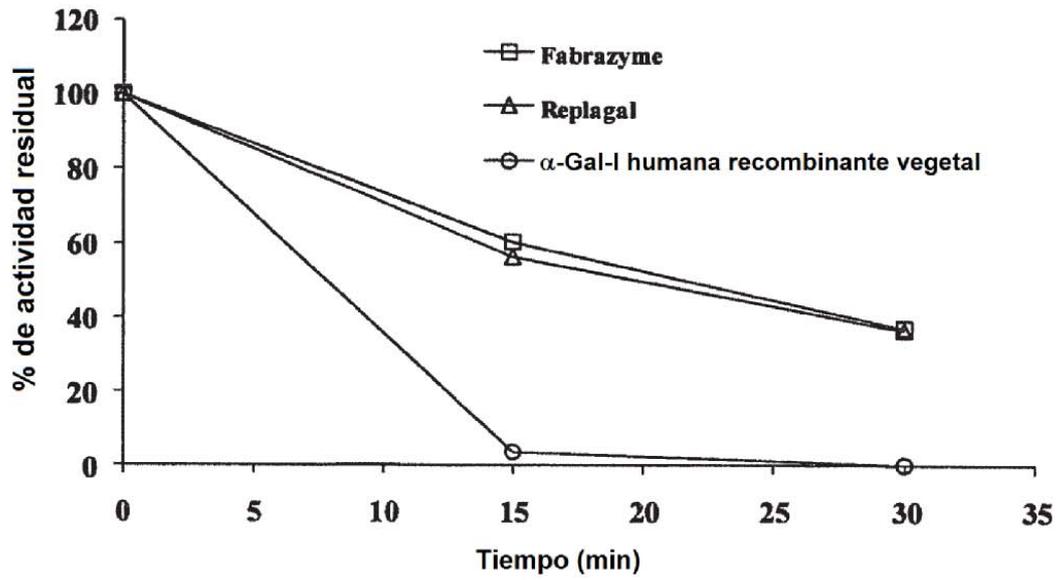


FIG. 3

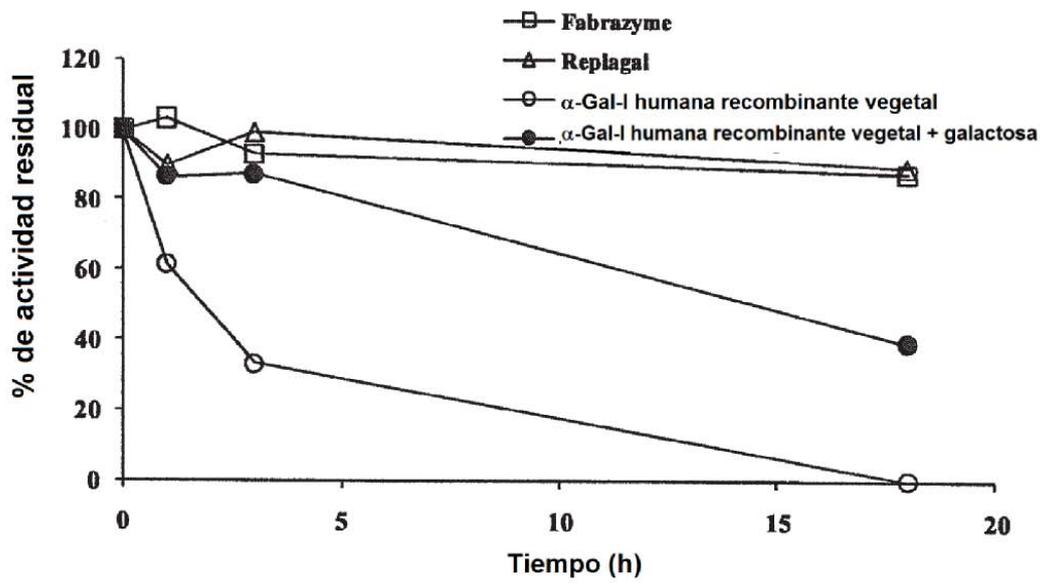


FIG. 4

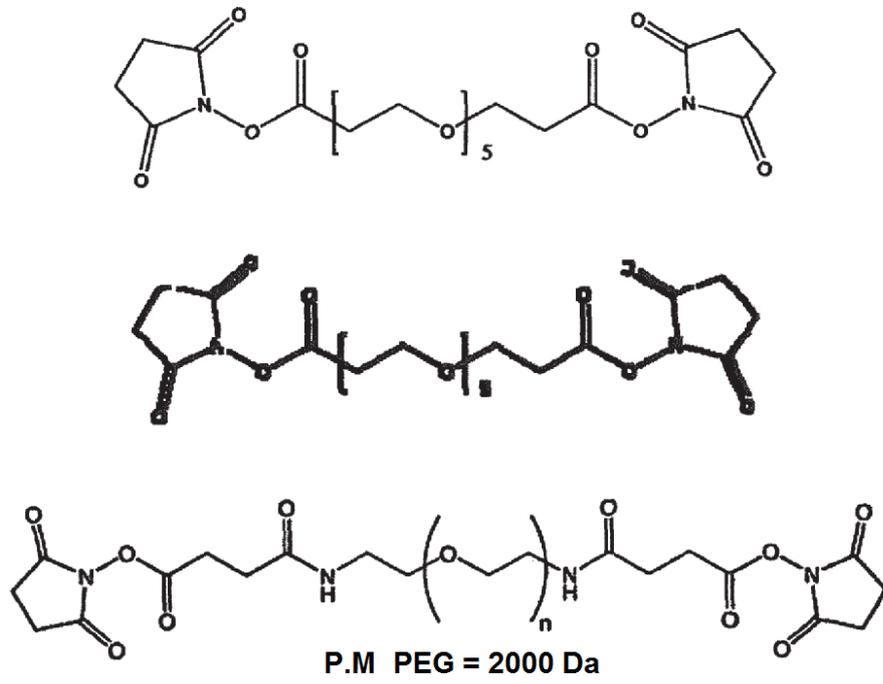


FIG. 5

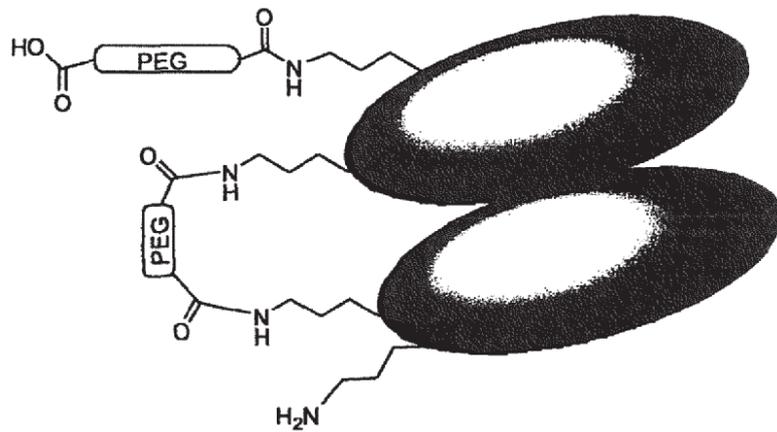


FIG. 6

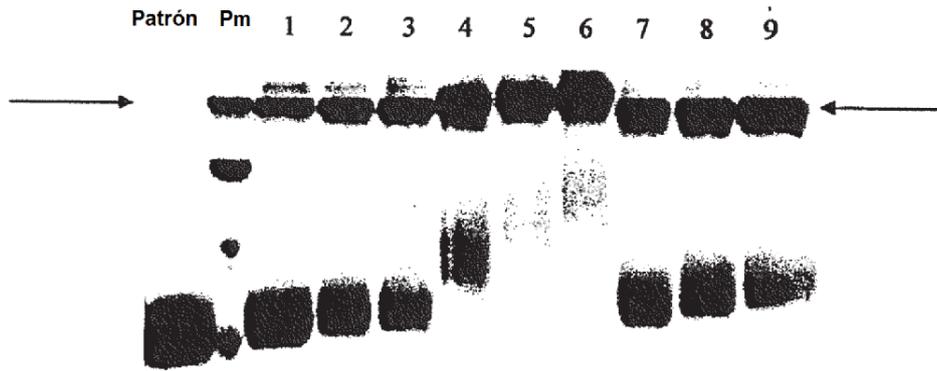


FIG. 7

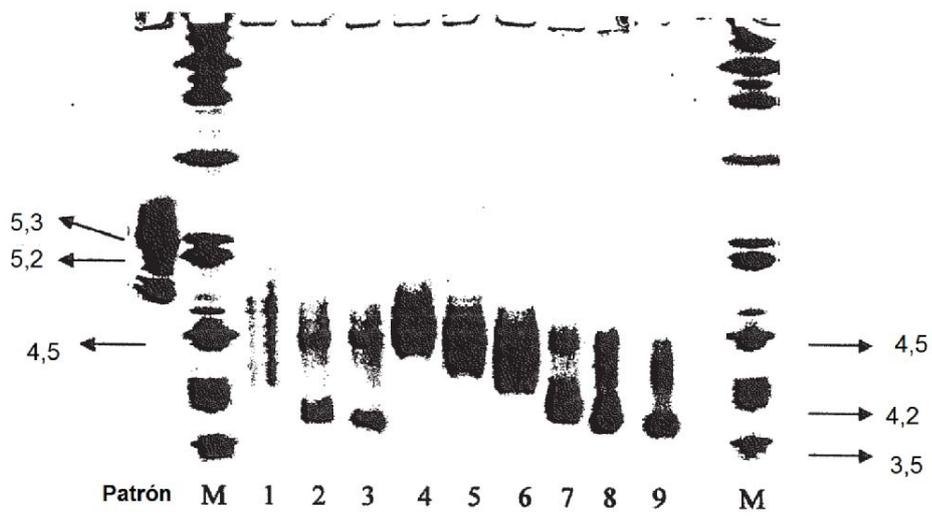


FIG. 8

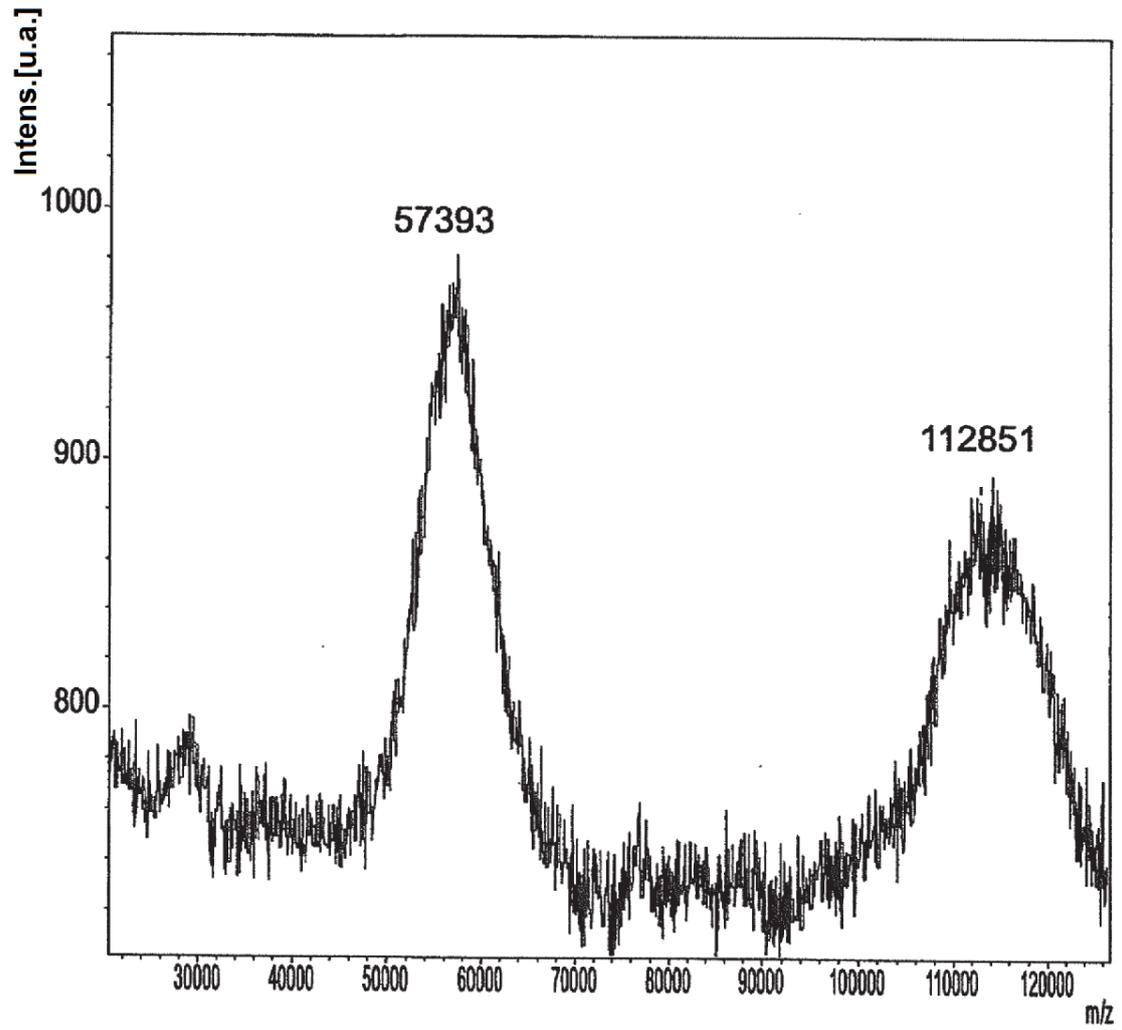


FIG. 9

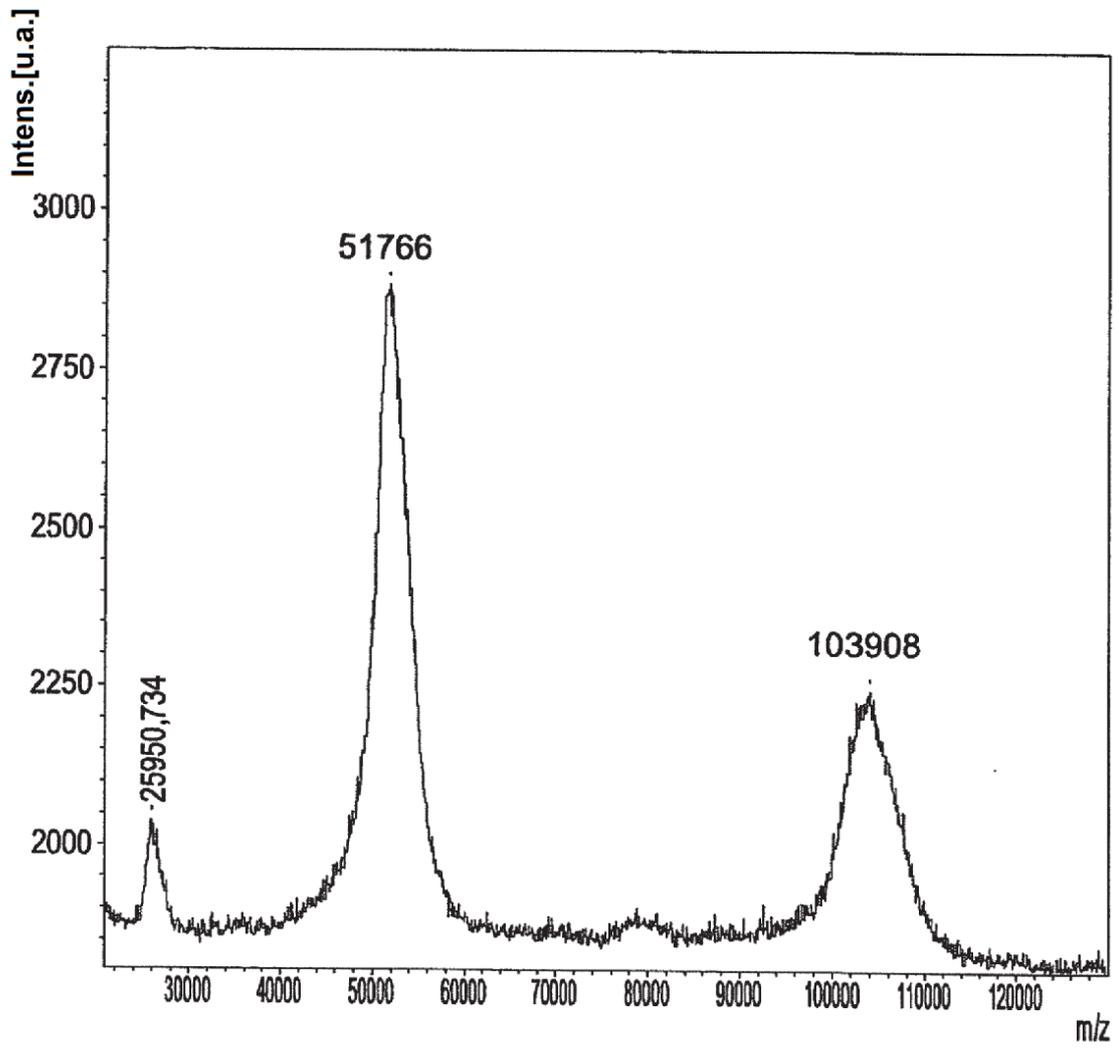


FIG. 10

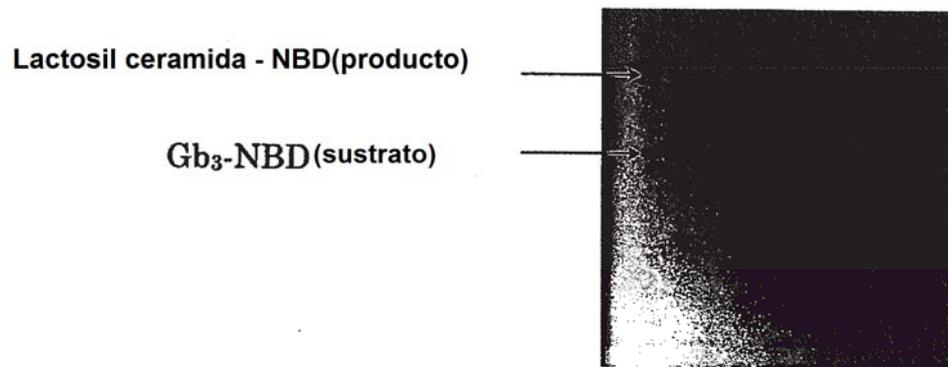


FIG. 11

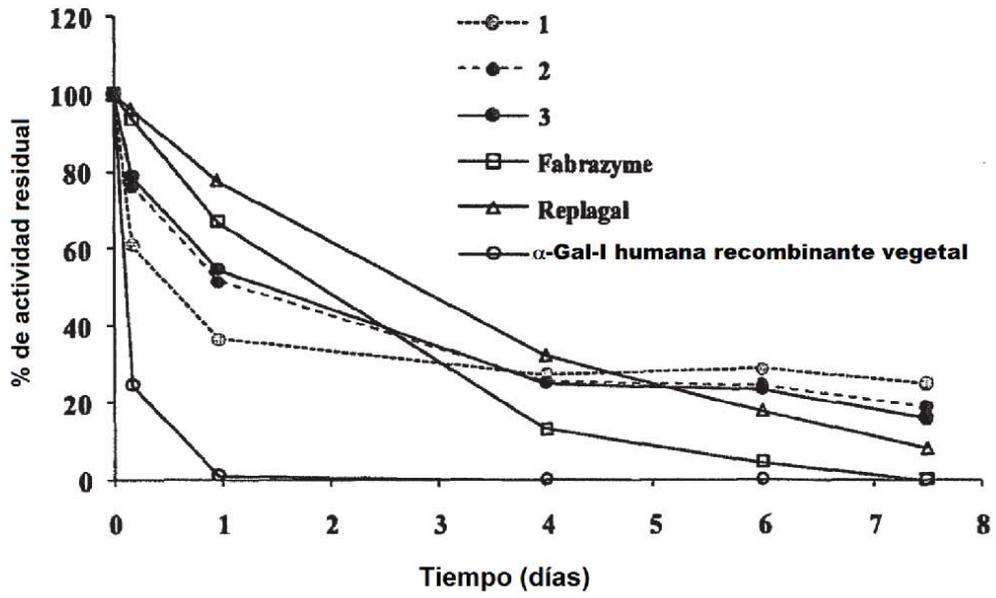


FIG. 12A

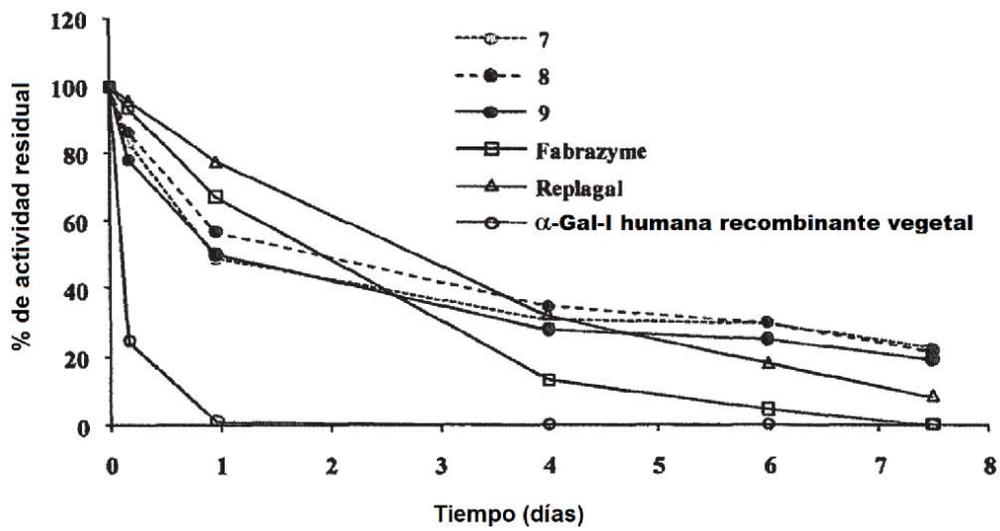


FIG. 12B

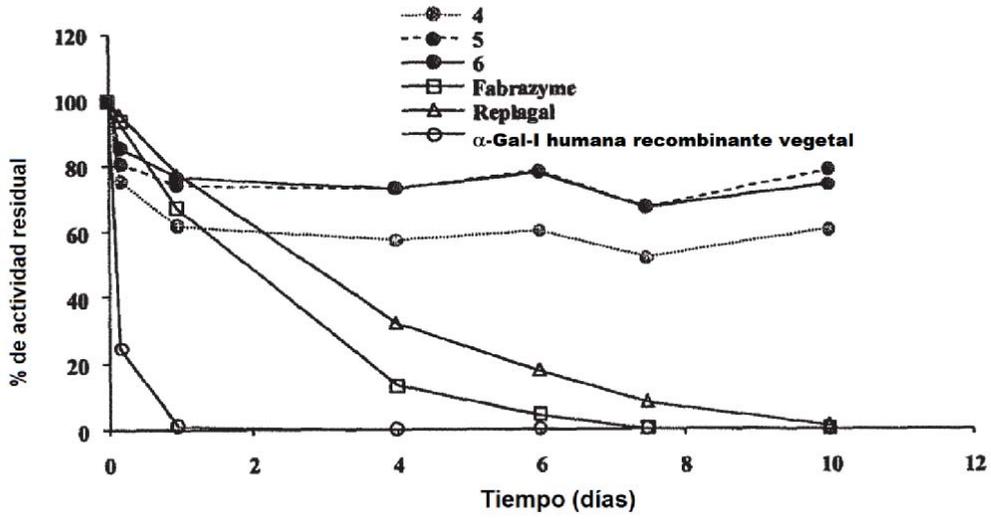


FIG. 12C

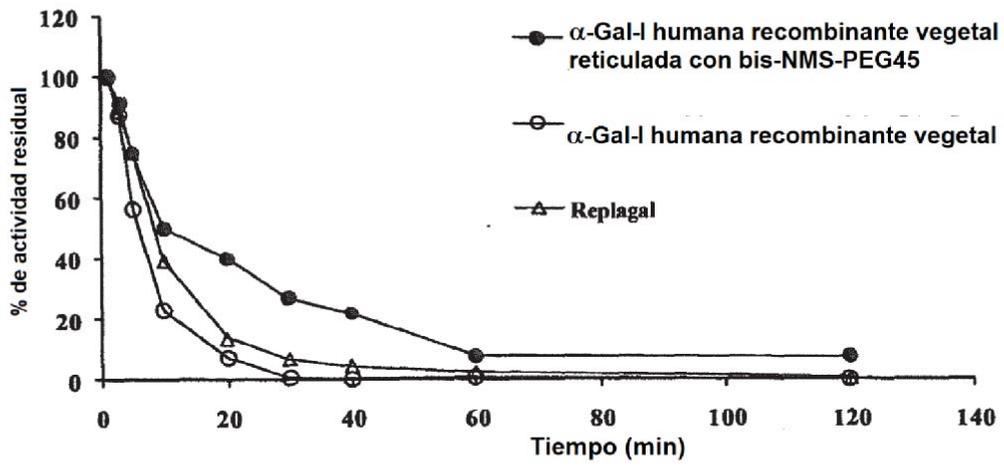


FIG. 13

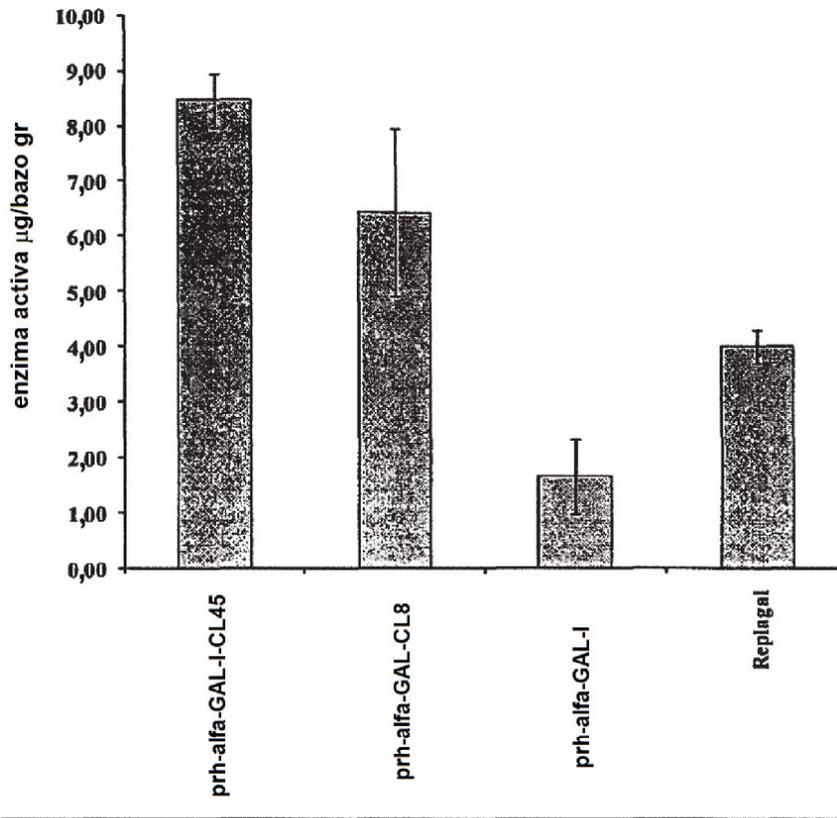


FIG. 14A

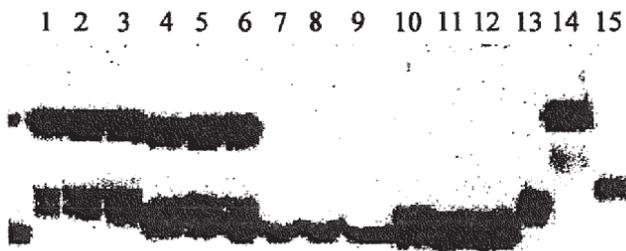


FIG. 14B

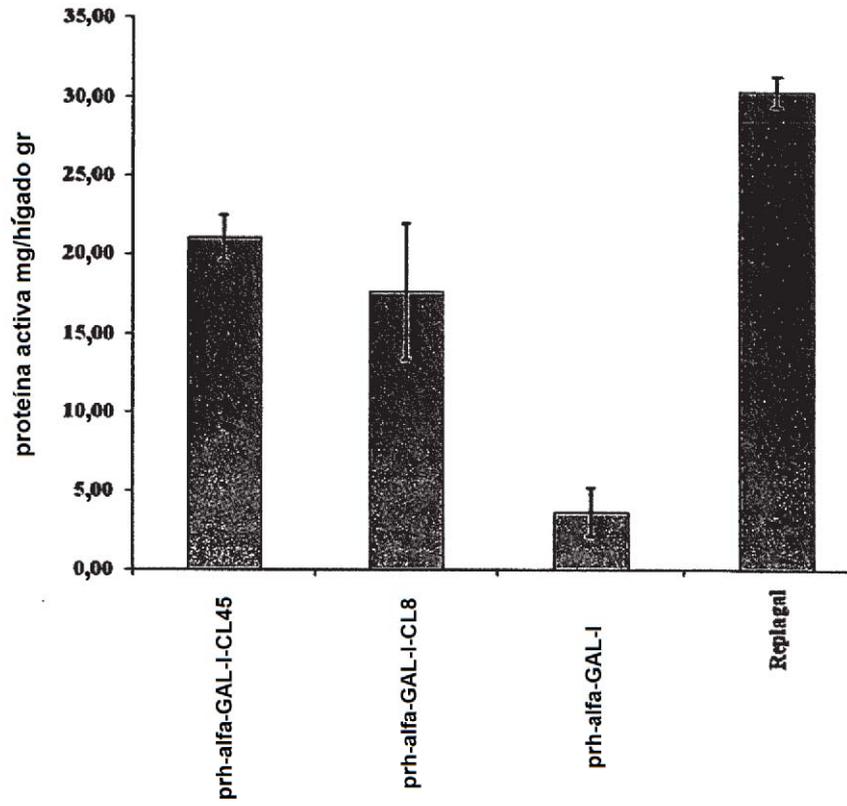


FIG. 15A

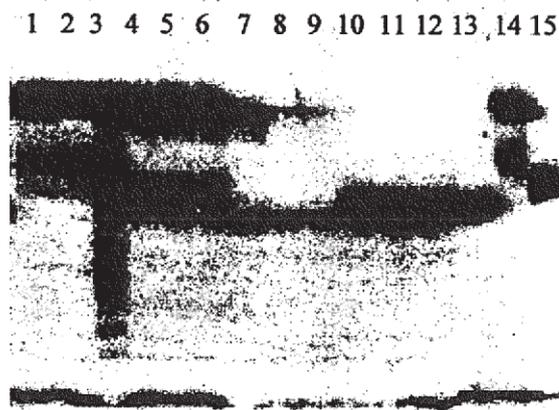


FIG. 15B

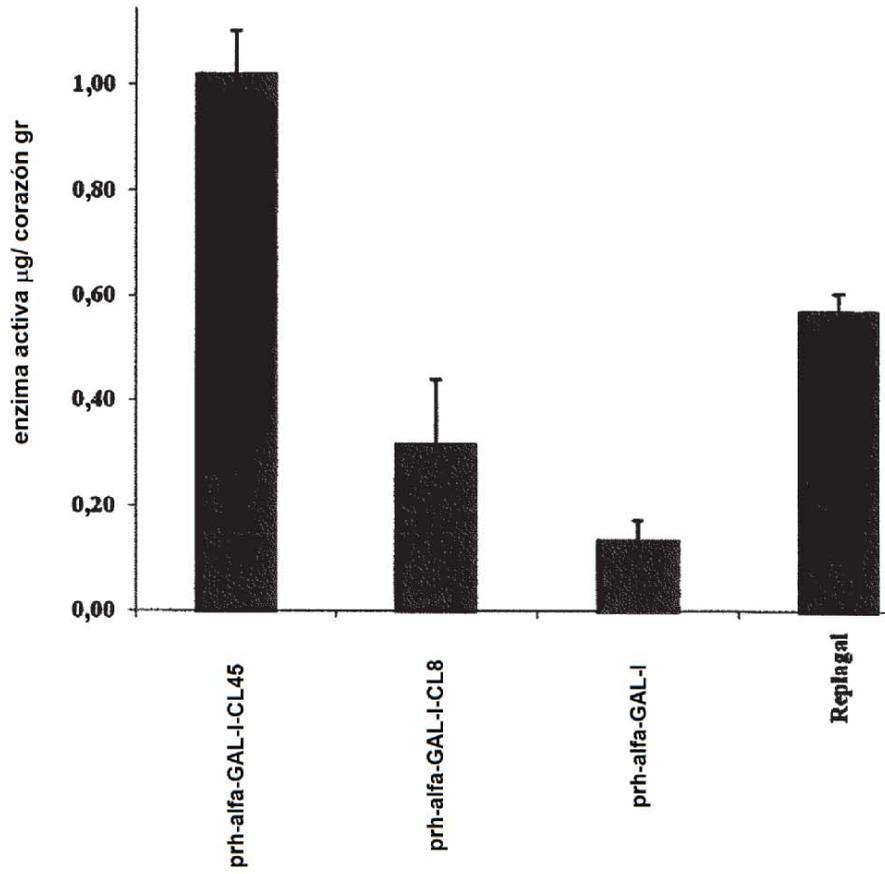


FIG. 16

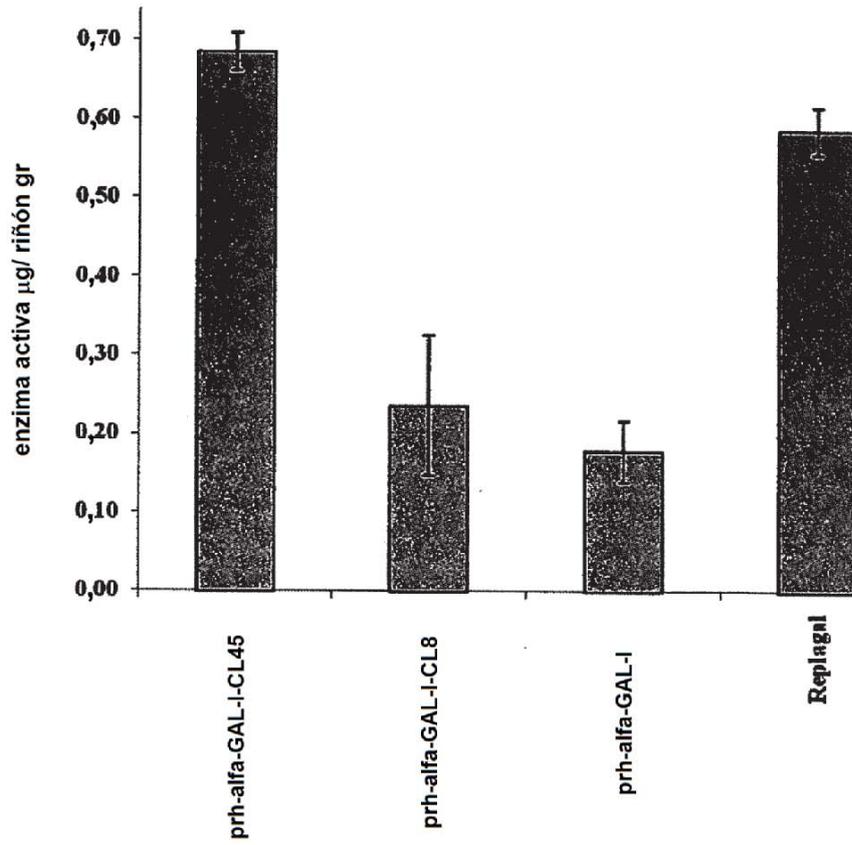


FIG. 17

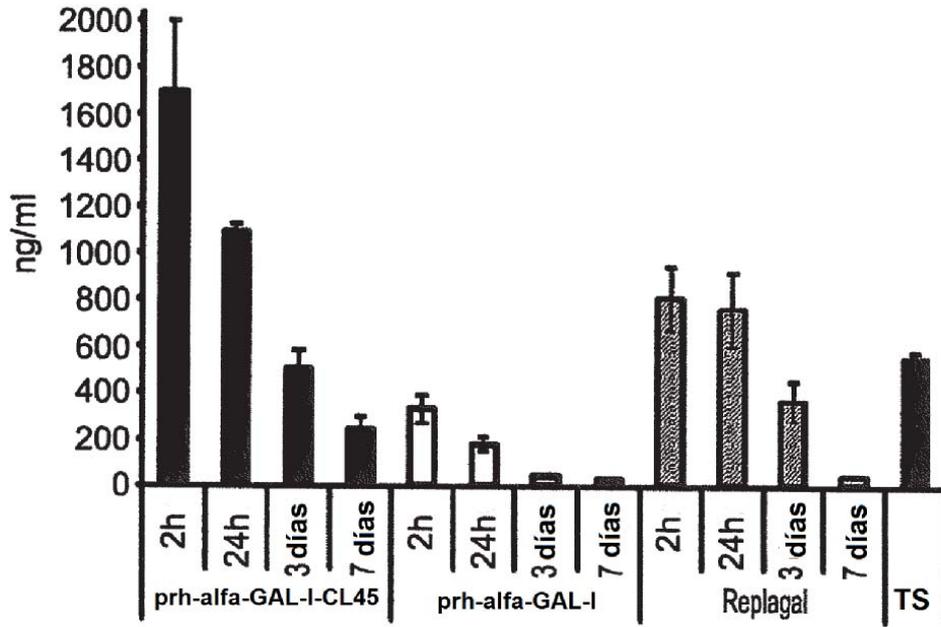


FIG. 18

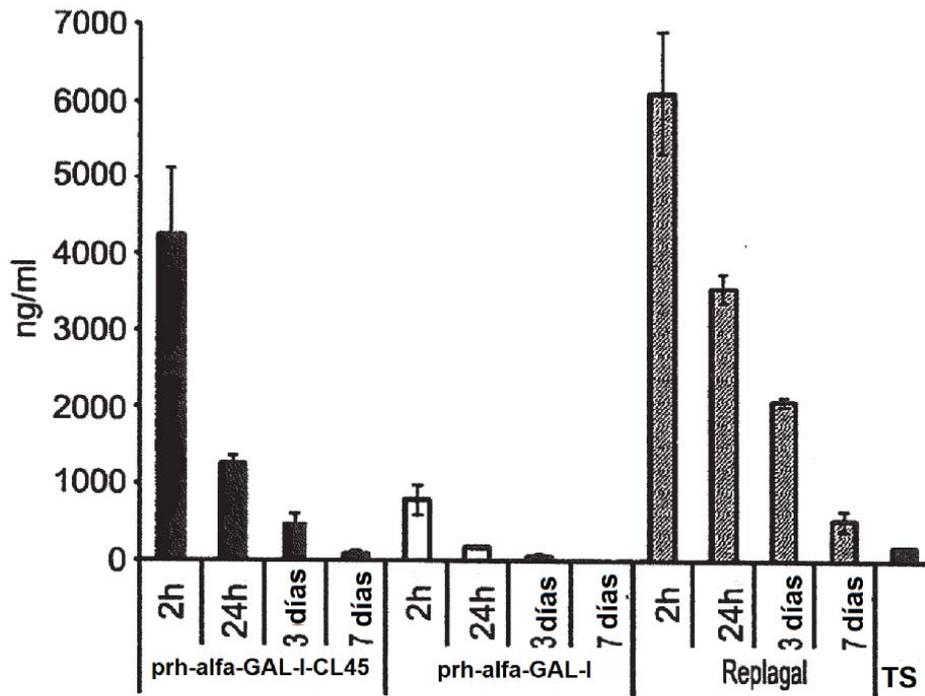


FIG. 19

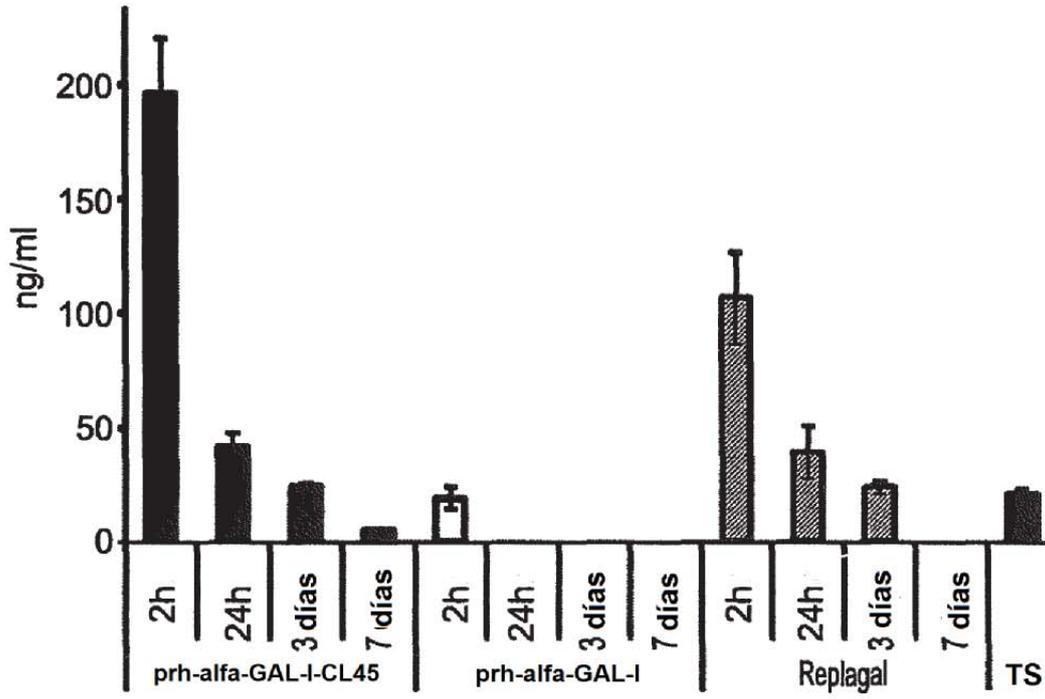


FIG. 20

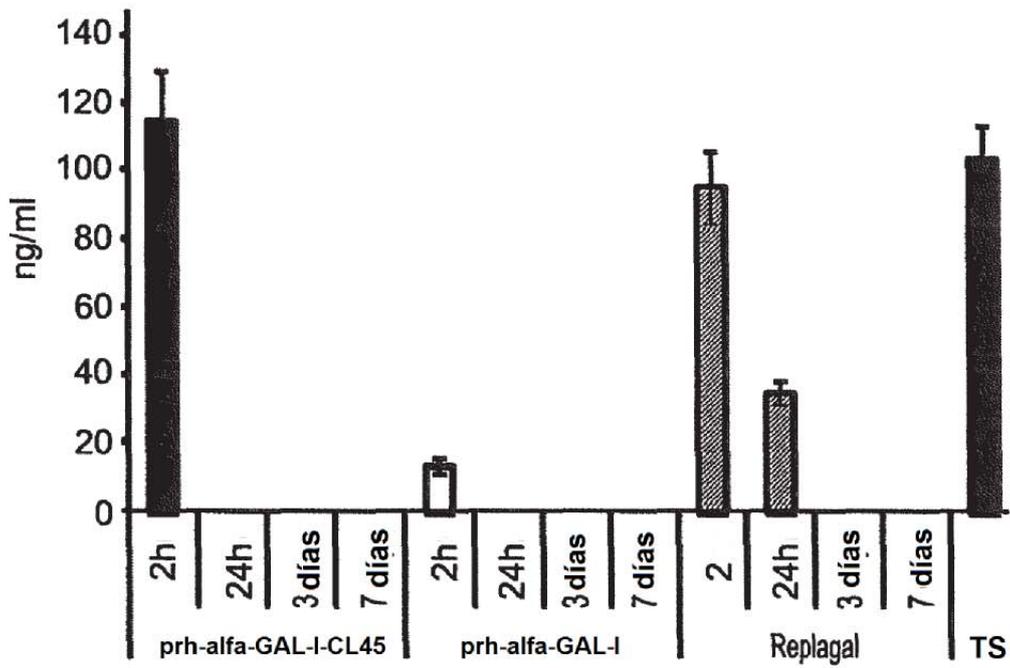


FIG. 21

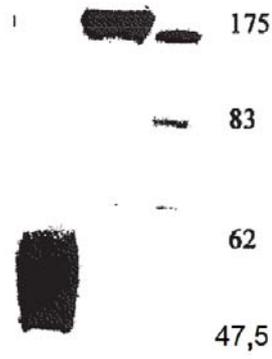


FIG. 22

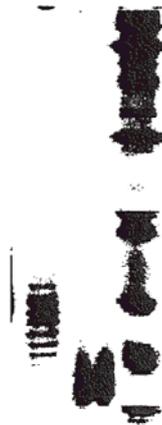


FIG. 23

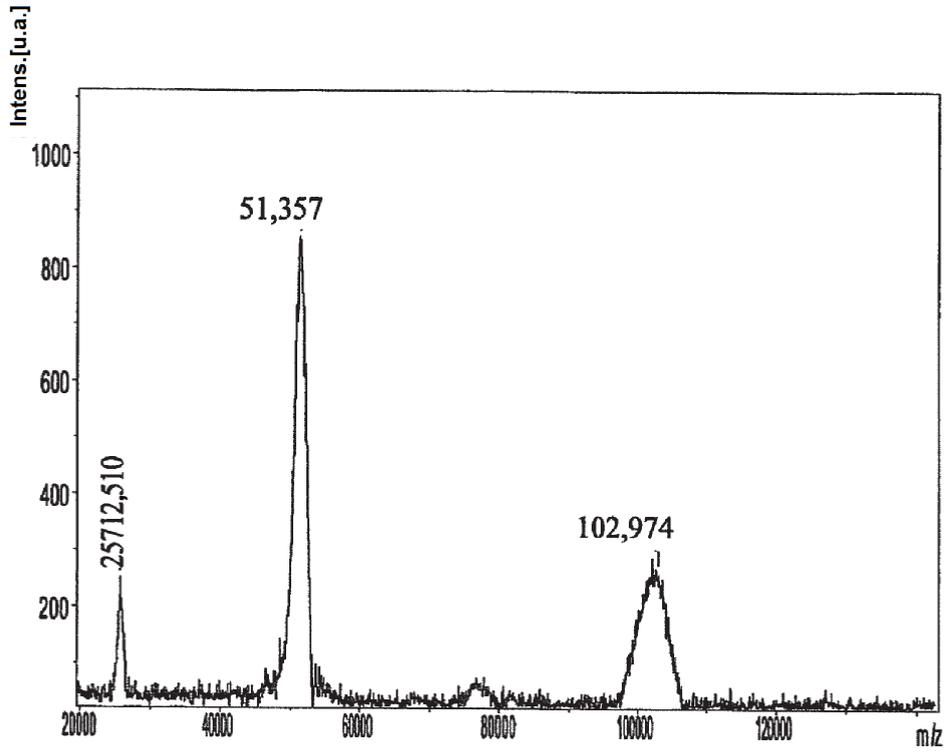


FIG. 24A

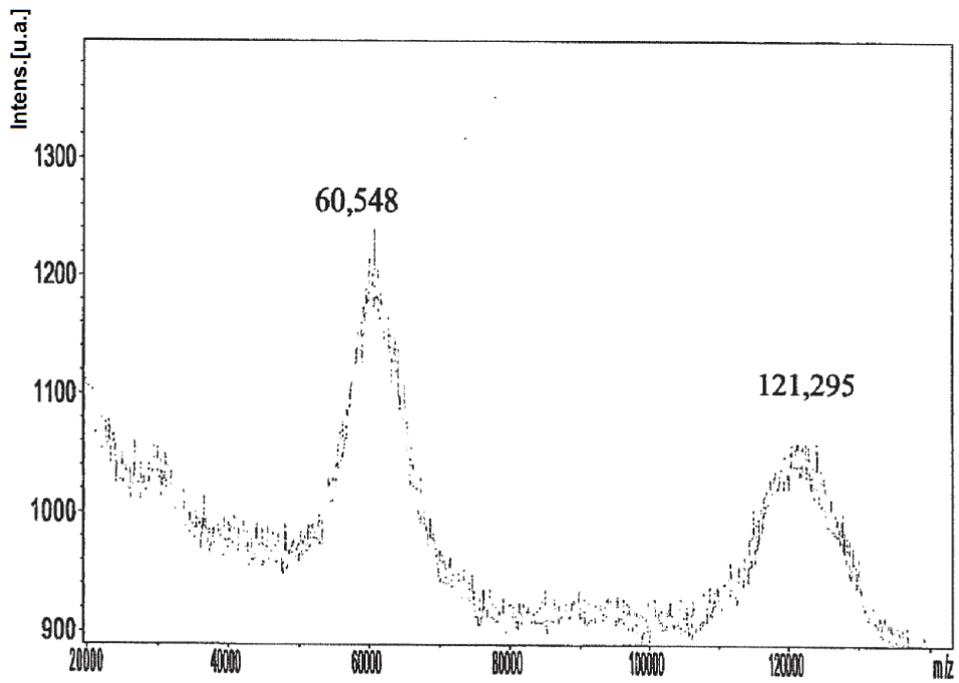


FIG. 24B

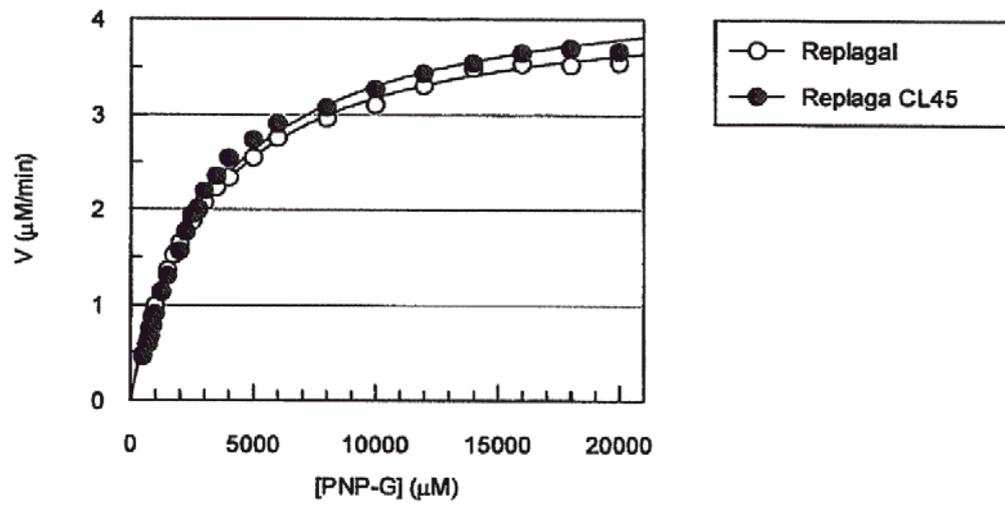


FIG. 25

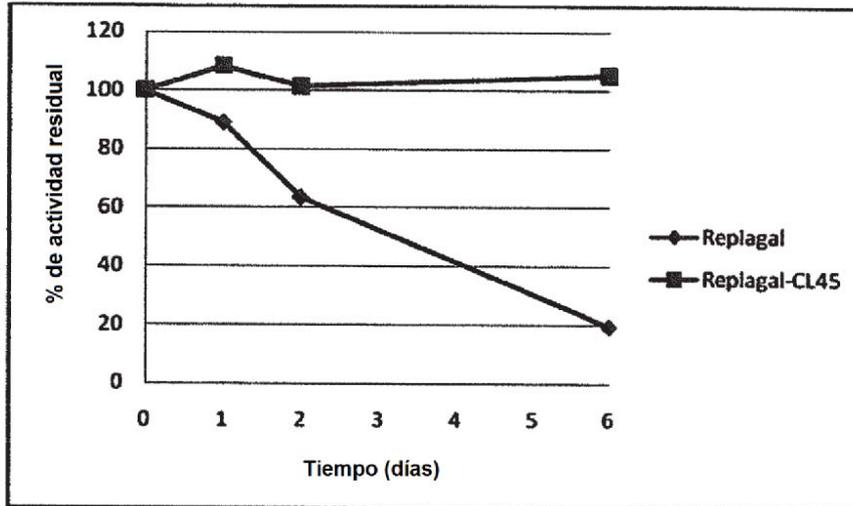


FIG. 26A

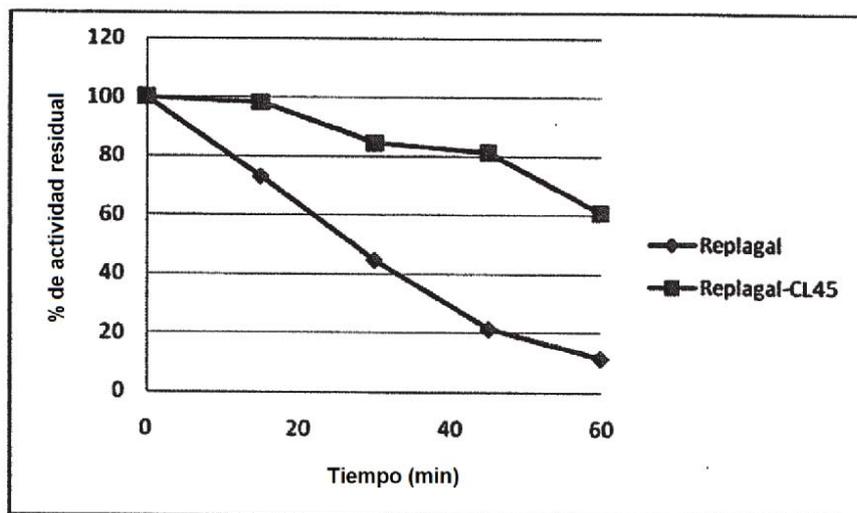


FIG. 26B

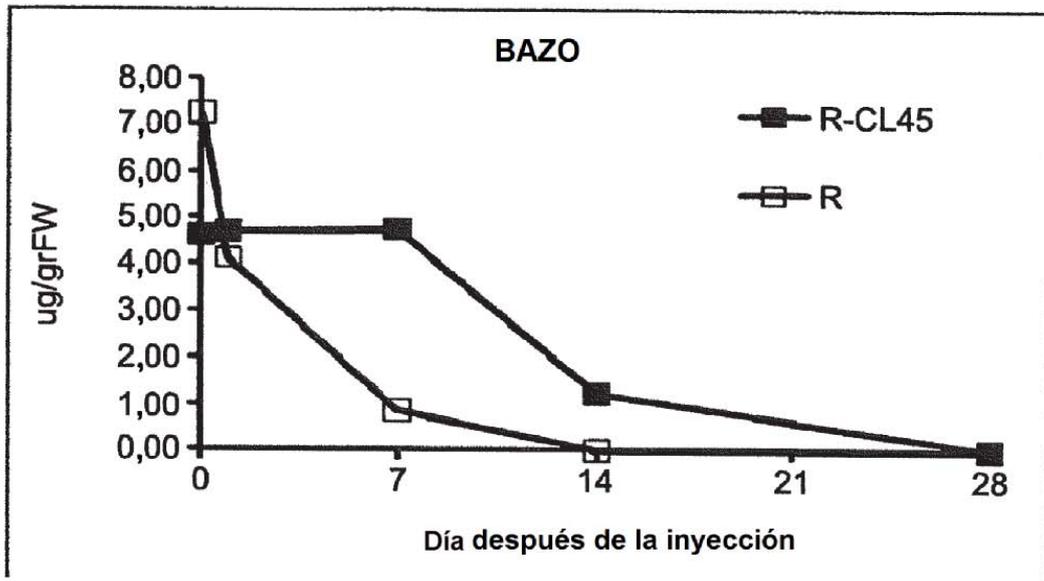


FIG. 27A

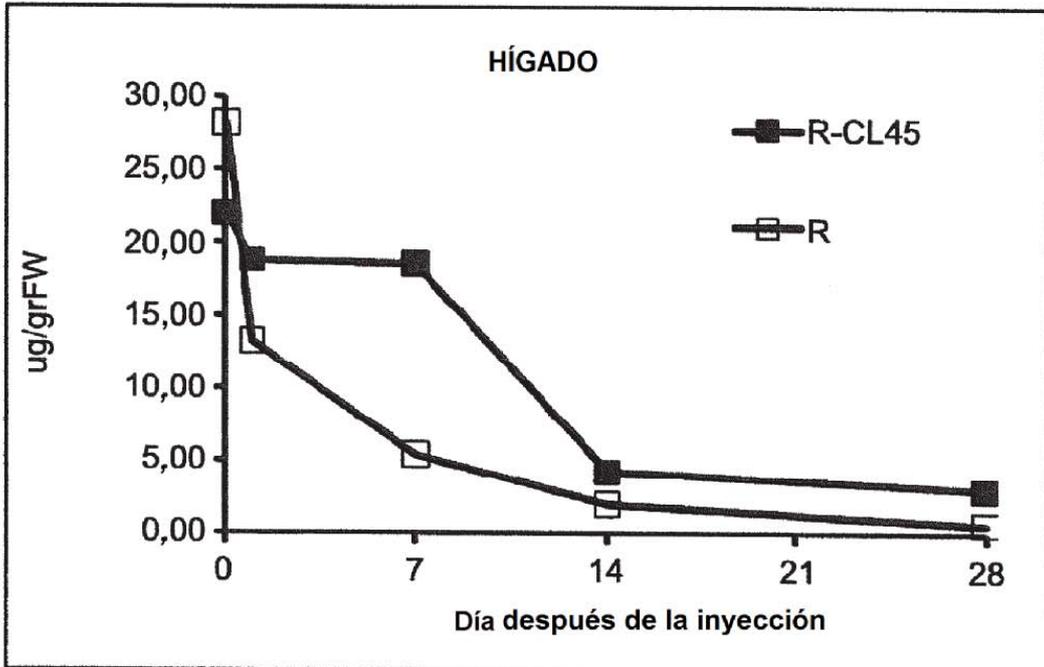


FIG. 27B

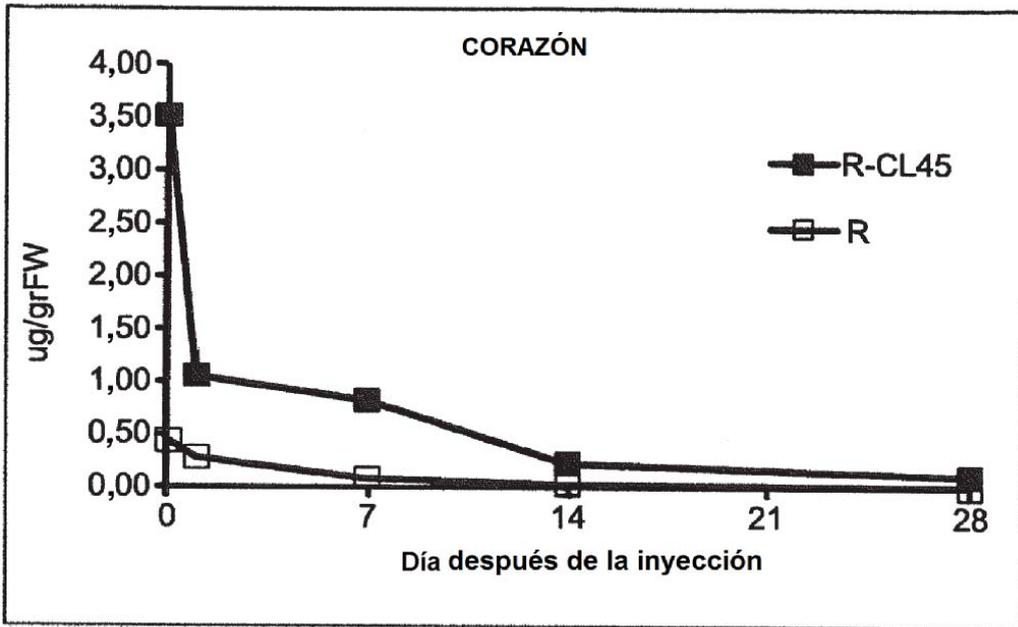


FIG. 27C

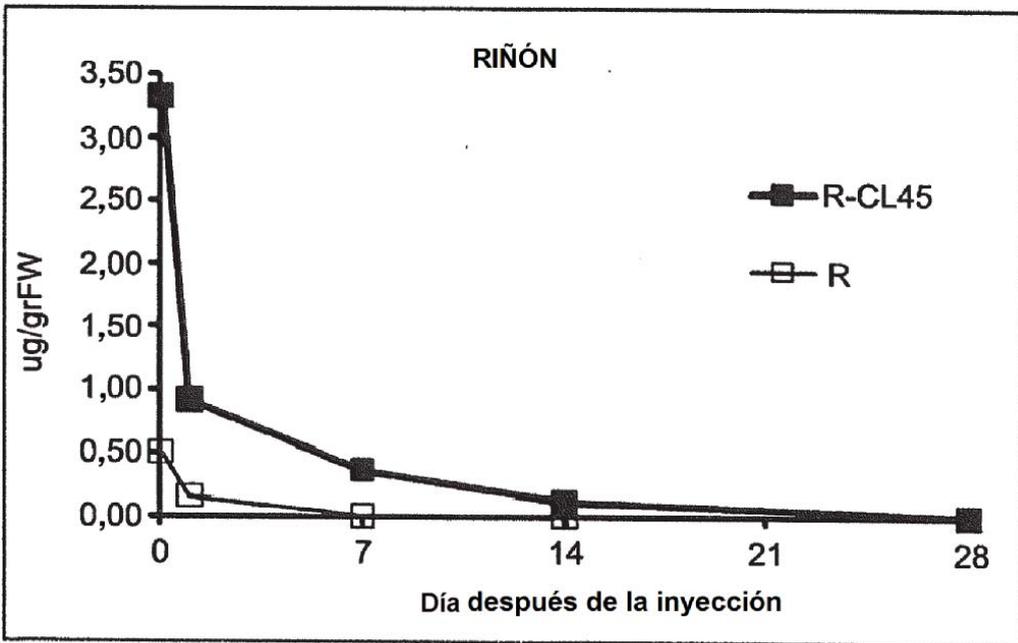


FIG. 27D

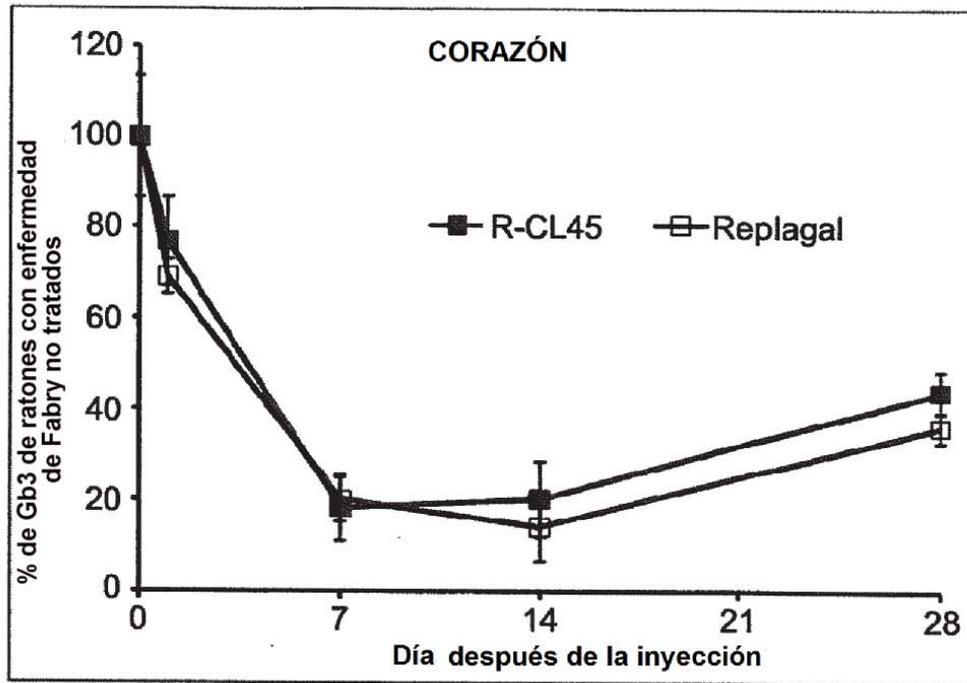


FIG. 28A

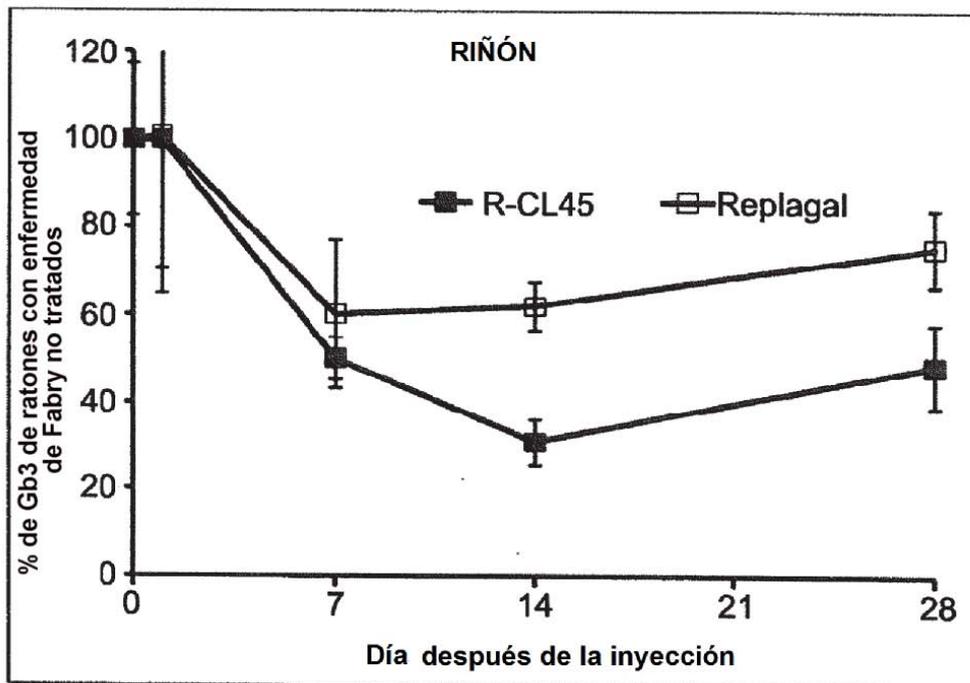


FIG. 28B

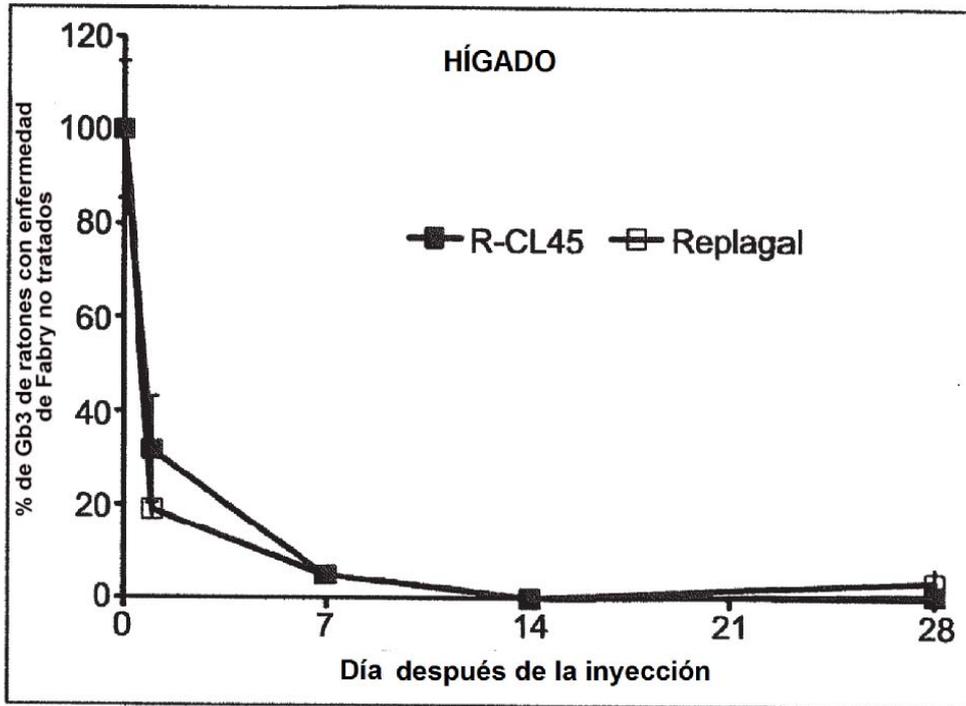


FIG. 28C

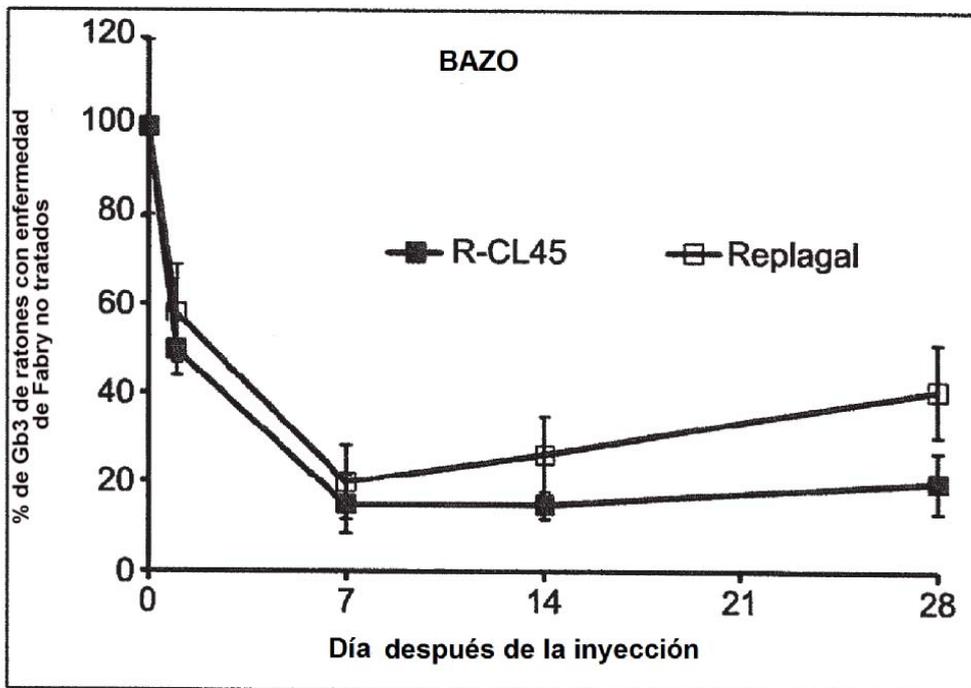


FIG. 28D

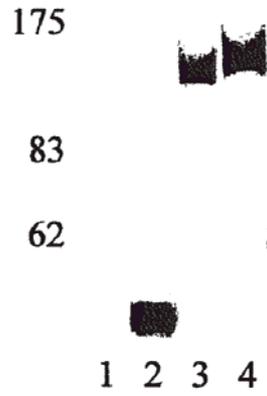


FIG. 29A

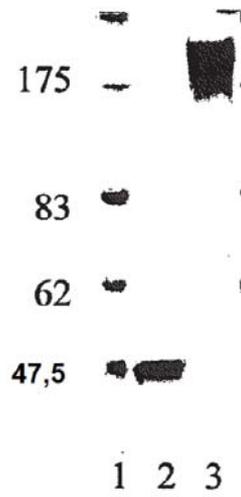


FIG. 29B

FIG. 30A

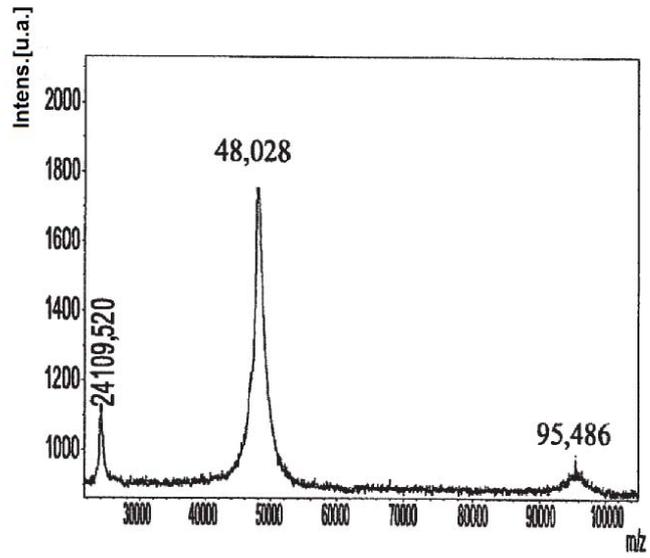


FIG. 30B

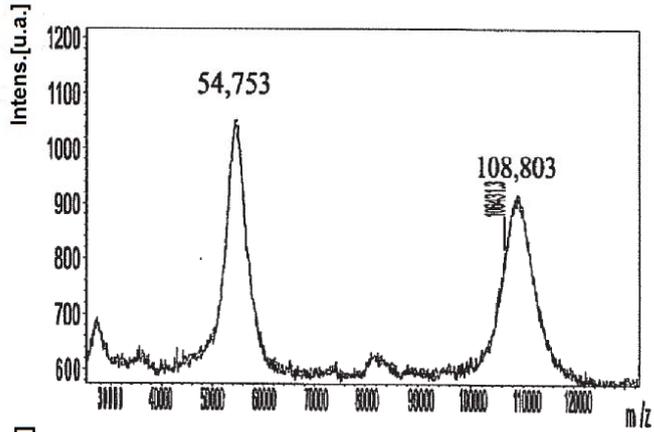
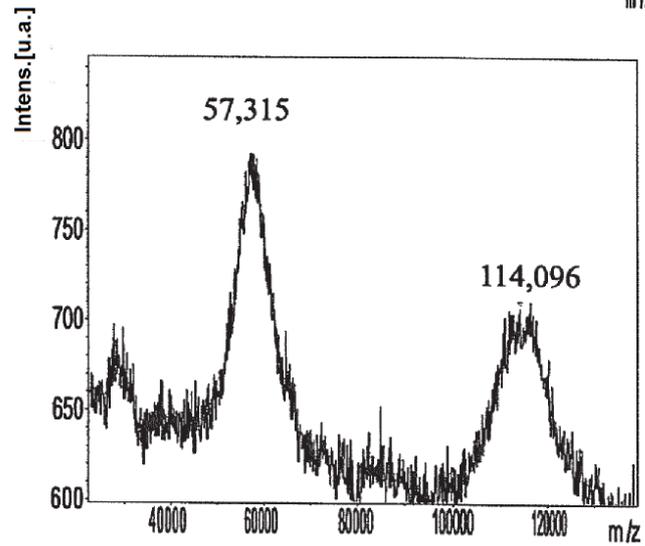


FIG. 30C



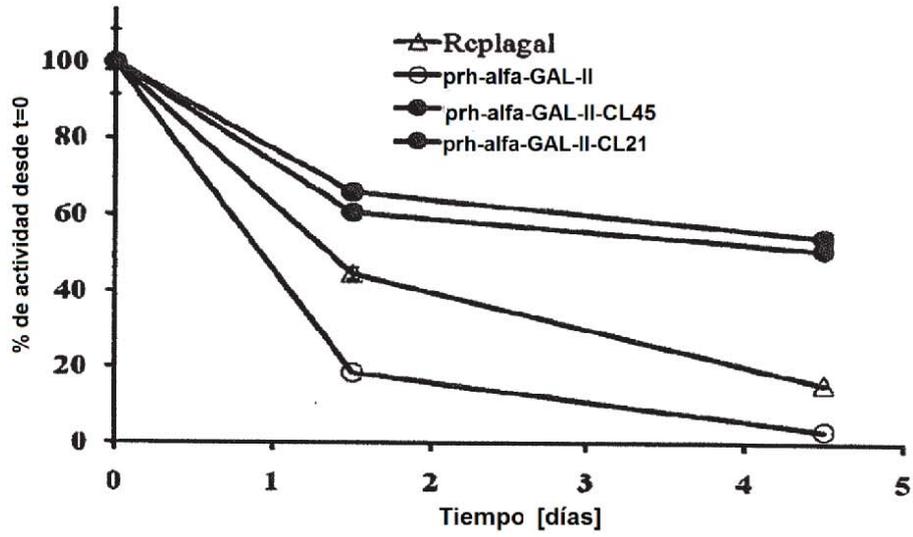


FIG. 31A

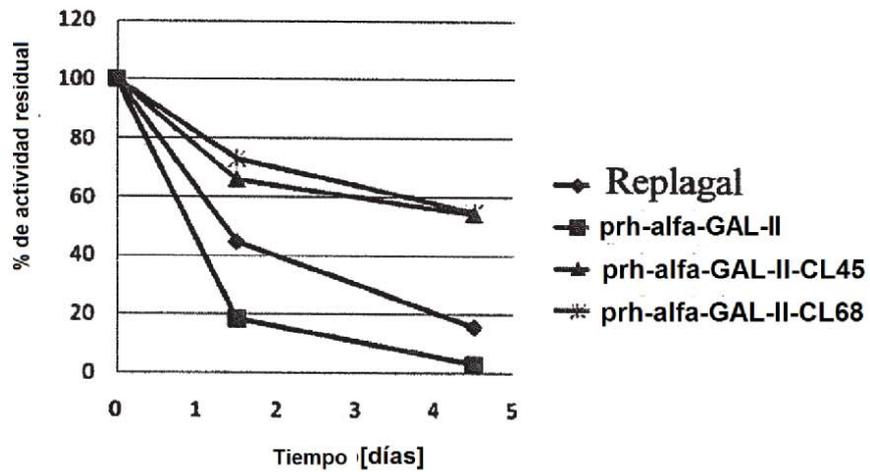


FIG. 31B

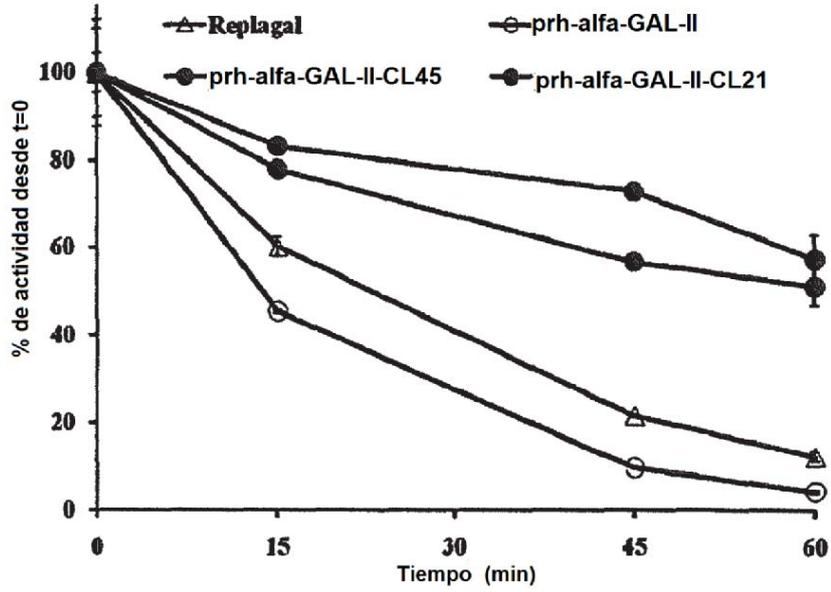


FIG. 31C

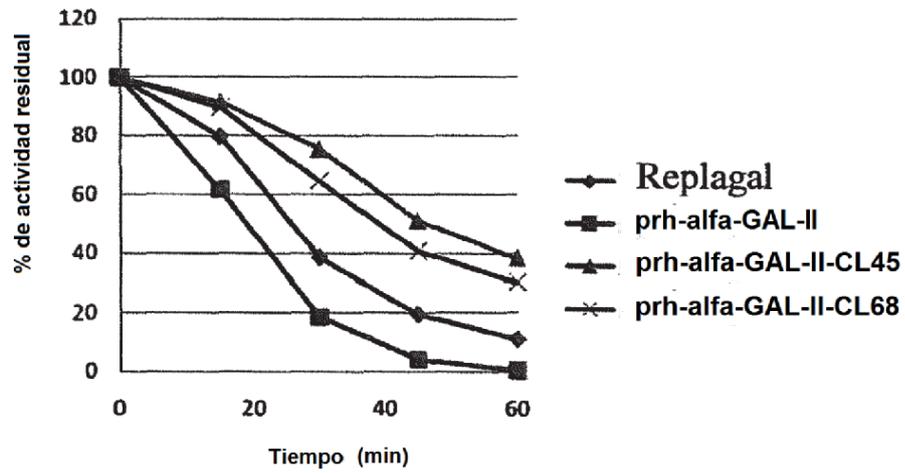


FIG. 31D

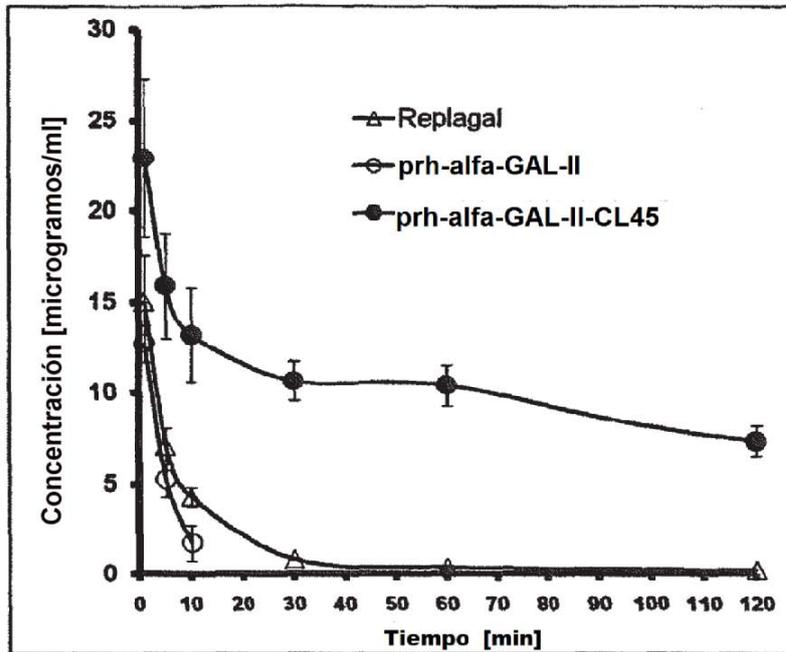


FIG. 32A

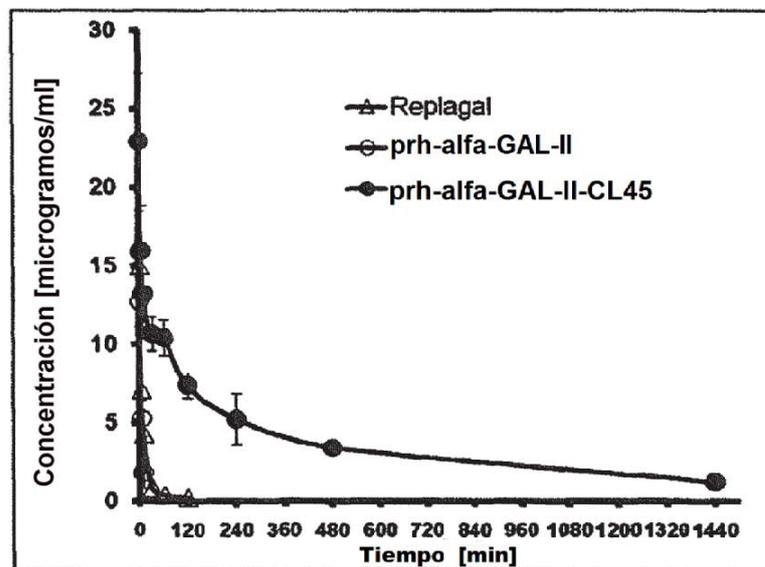


FIG. 32B

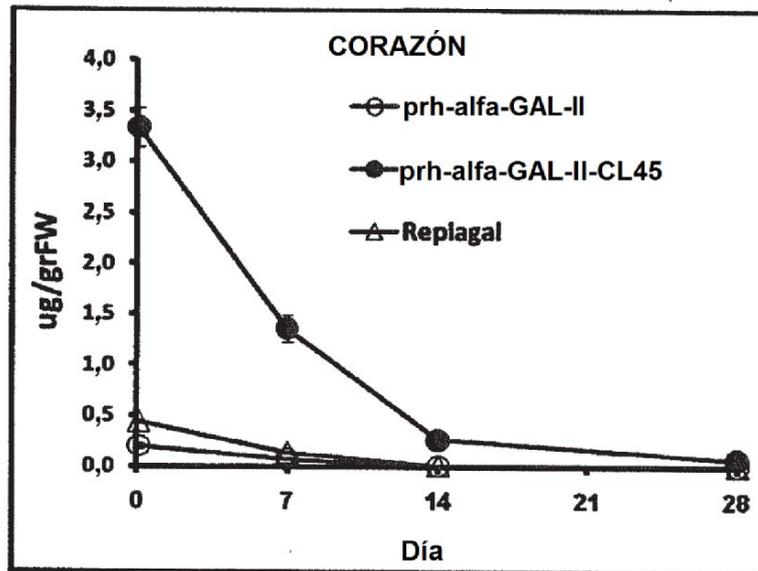


FIG. 33A

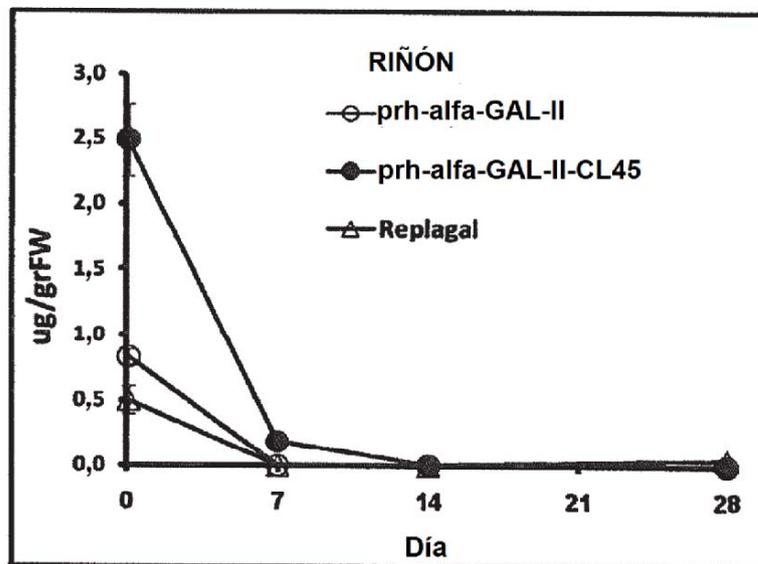


FIG. 33B

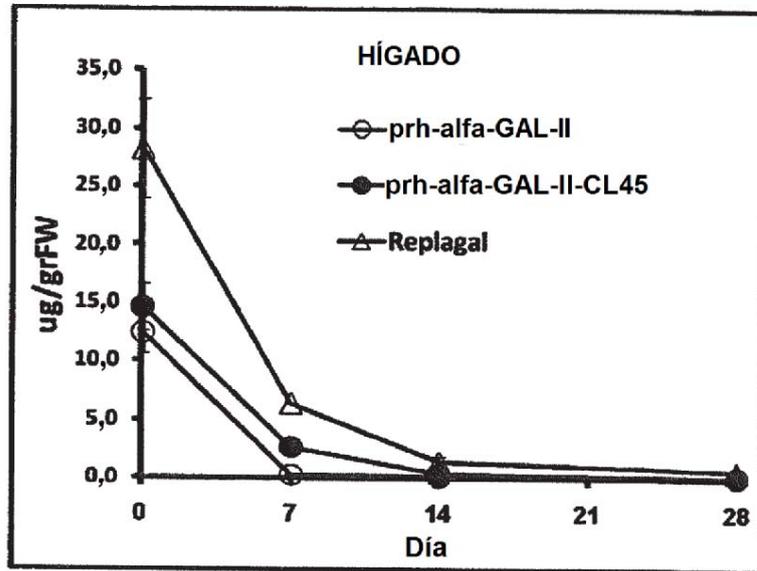


FIG. 33C

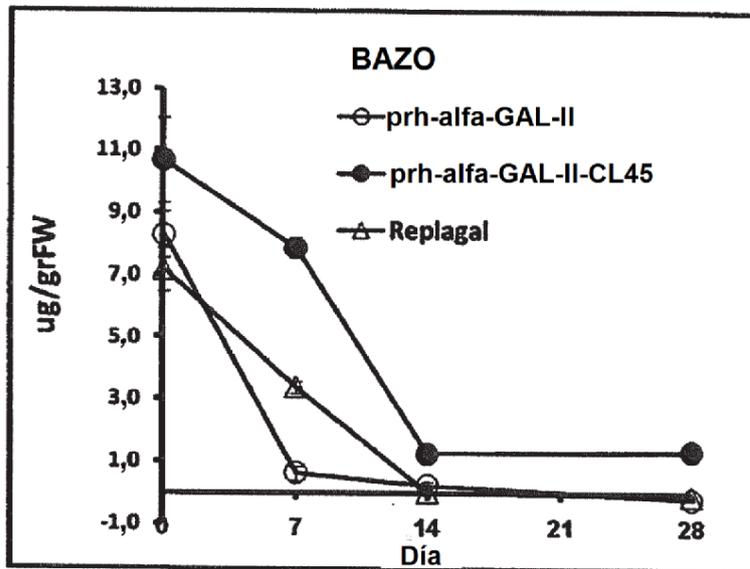


FIG. 33D

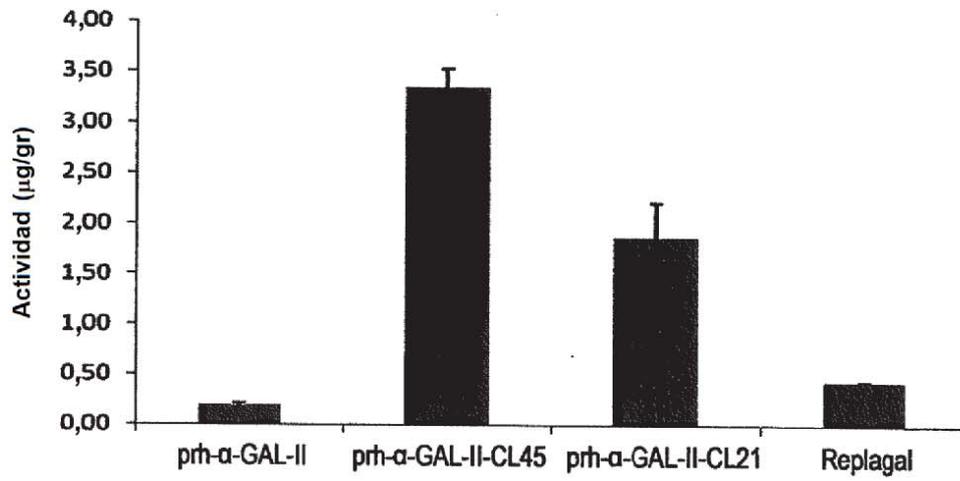


FIG. 33E

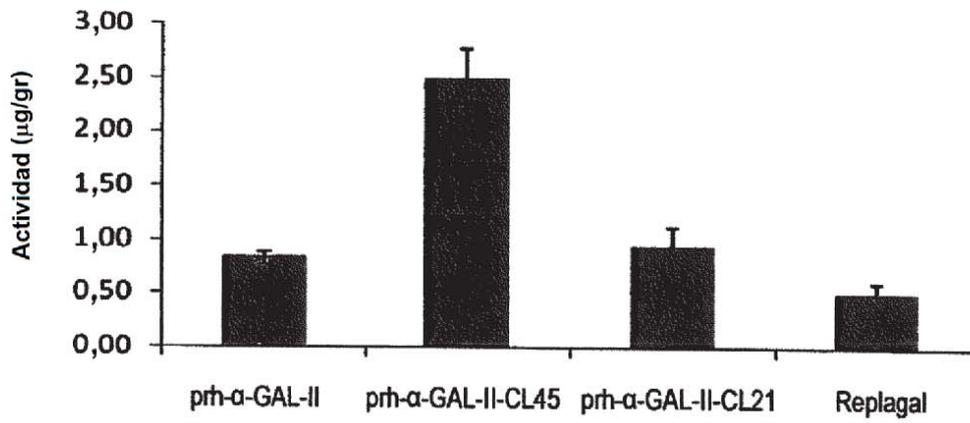


FIG. 33F

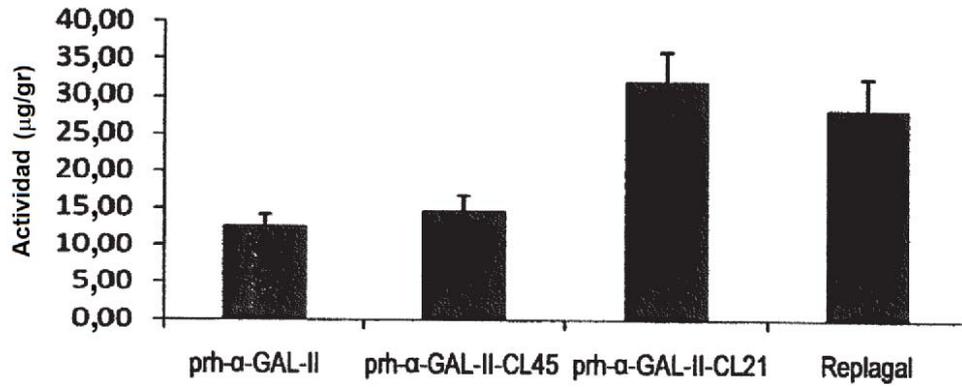


FIG. 33G

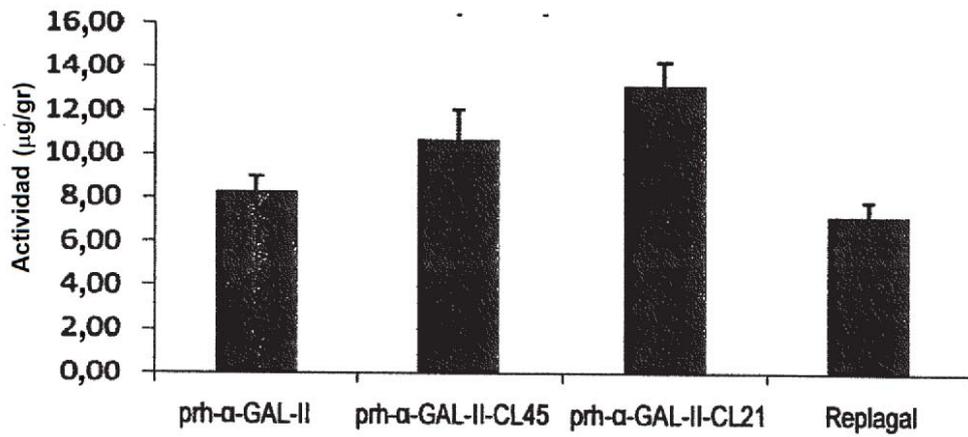


FIG. 33H

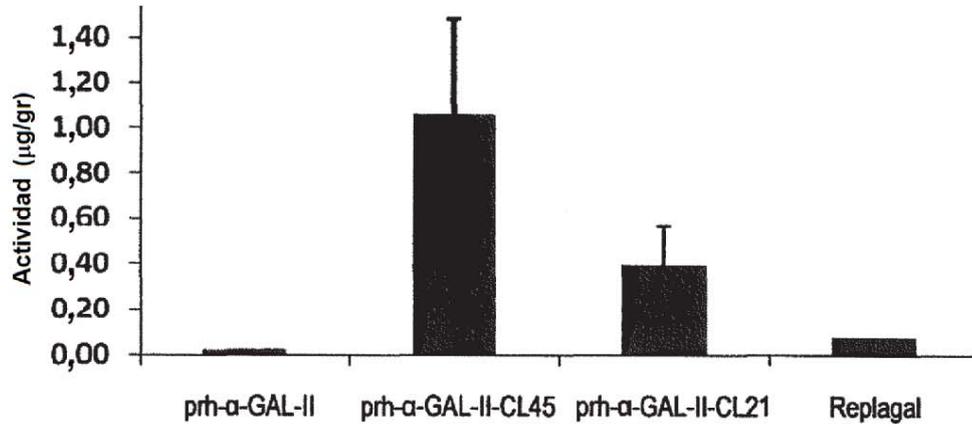


FIG. 33I

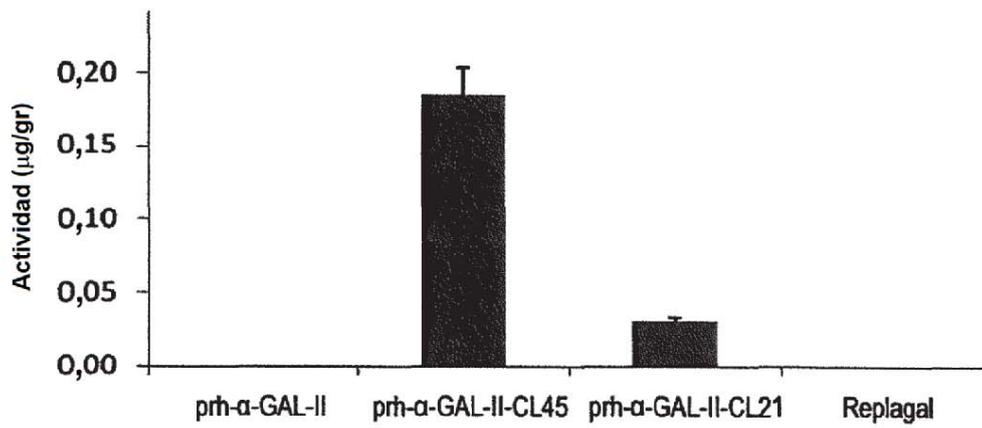


FIG. 33J

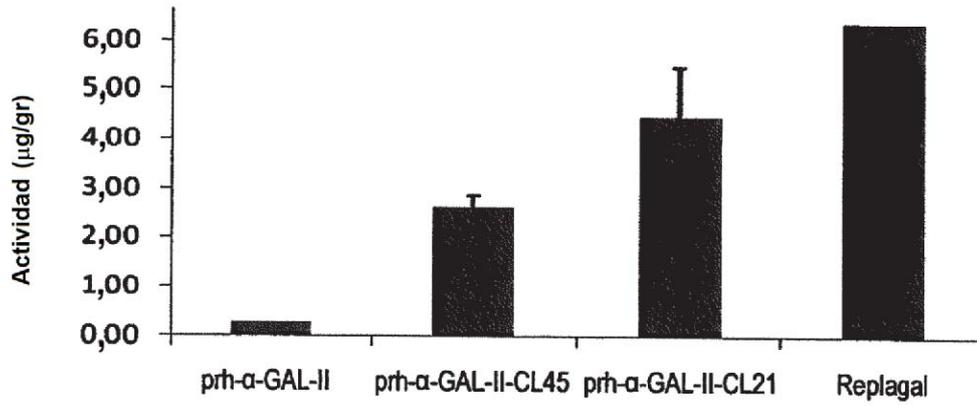


FIG. 33K

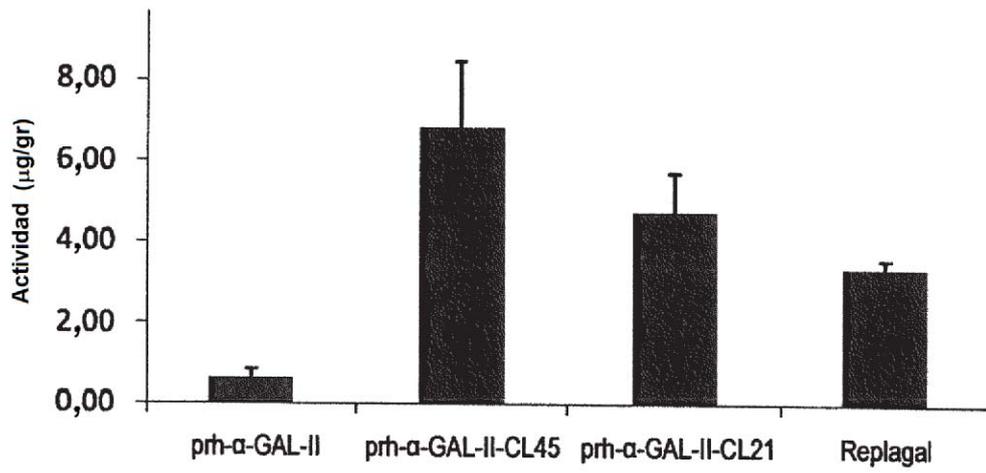


FIG. 33L

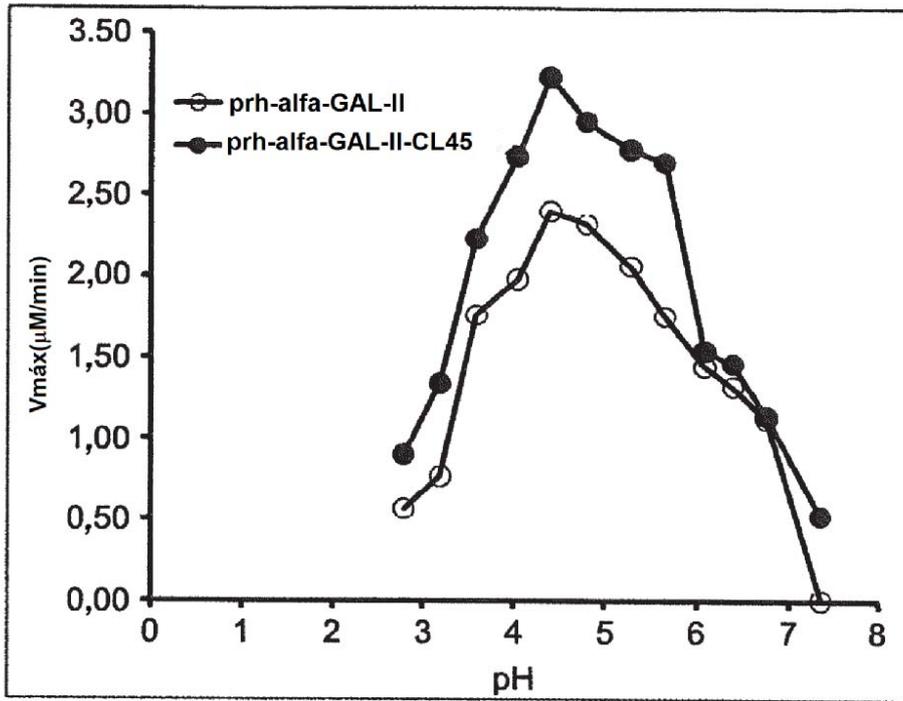


FIG. 34A

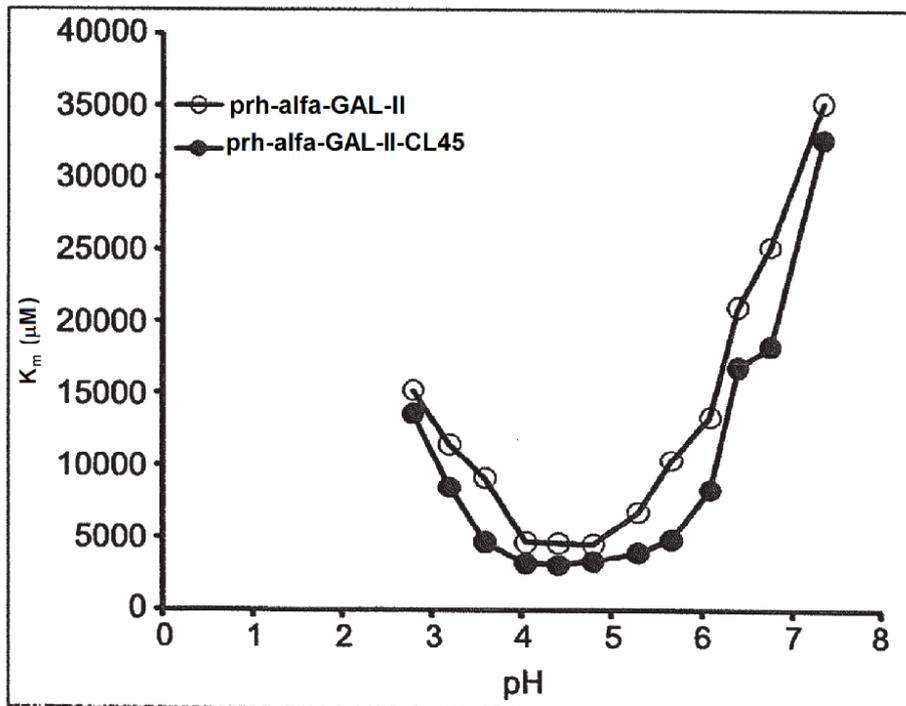


FIG. 34B

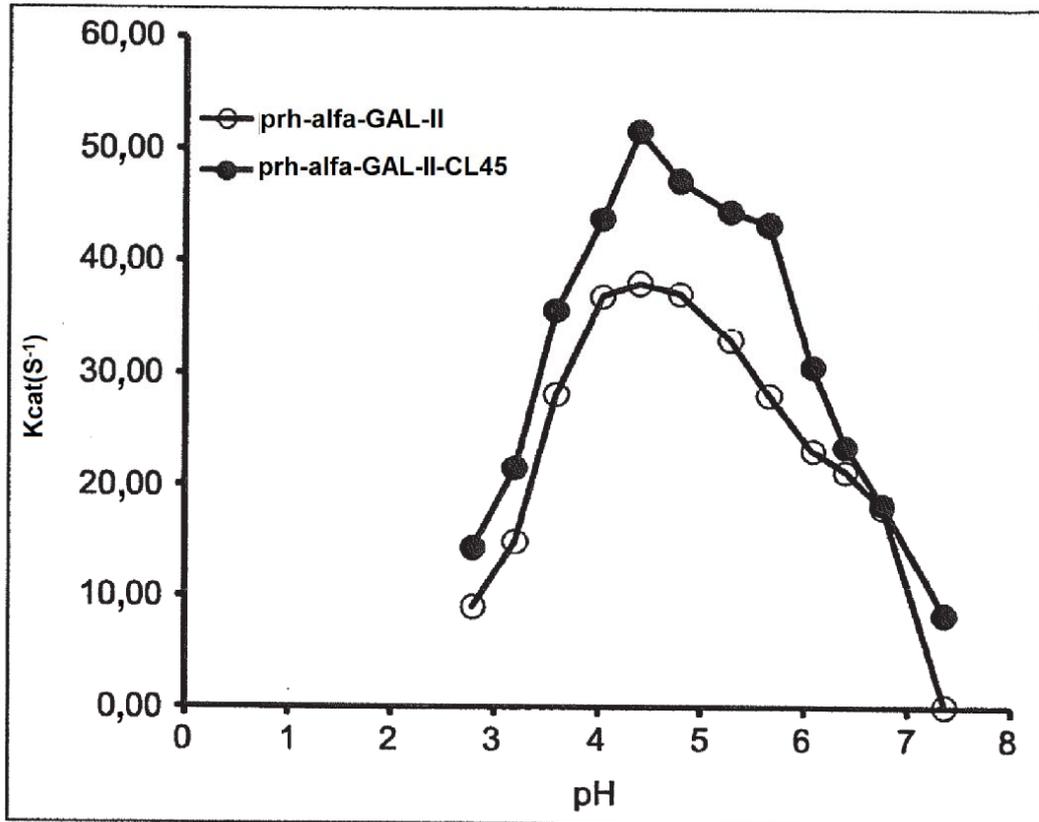


FIG. 34C

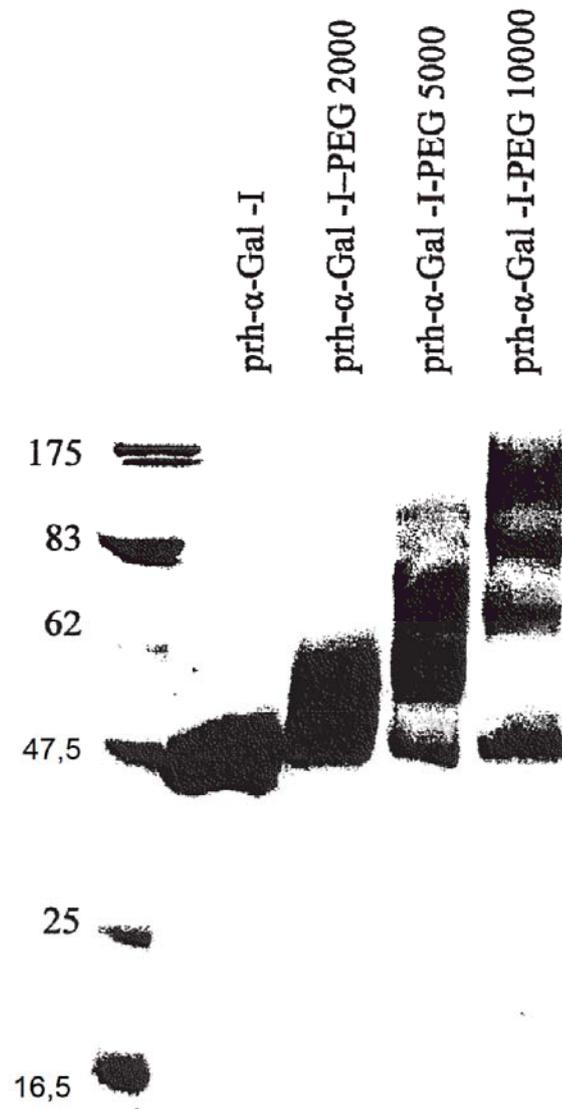


FIG. 35

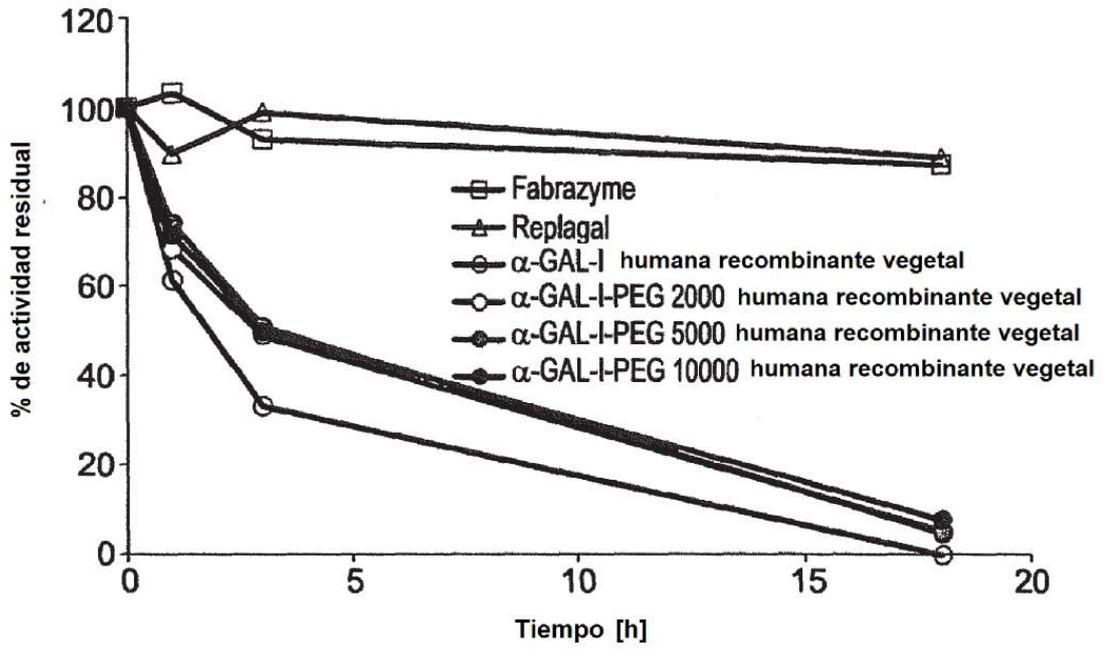


FIG. 36A

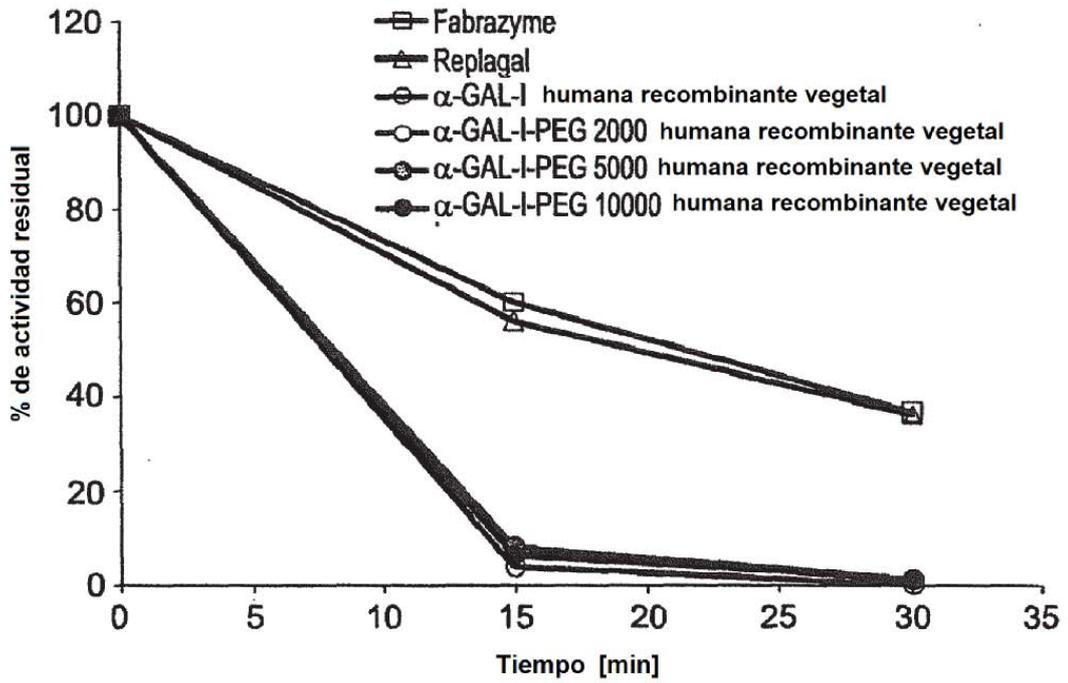


FIG. 36B



FIG. 37

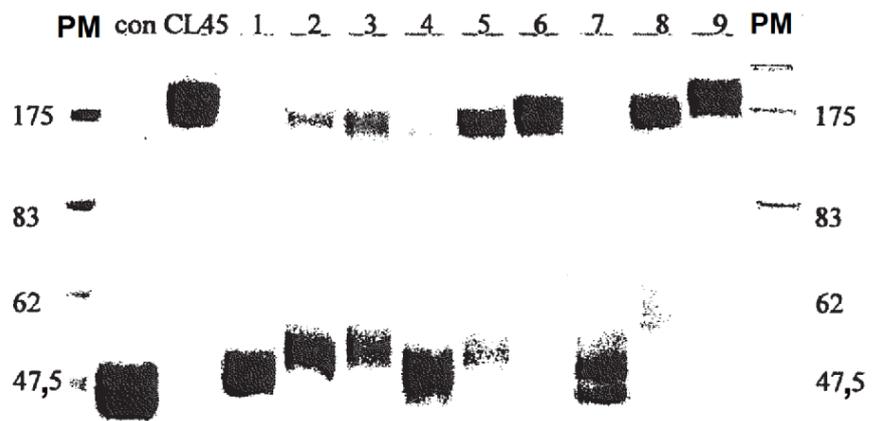


FIG. 38

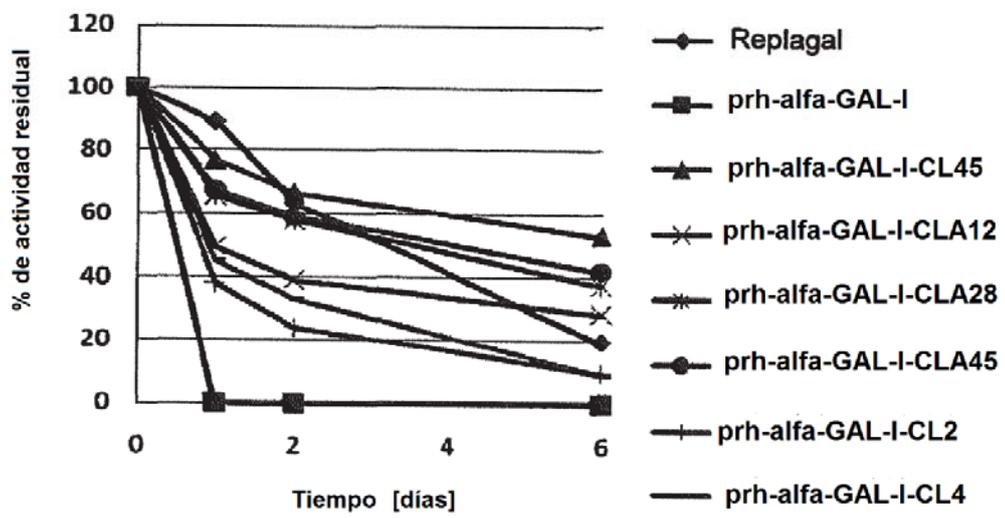


FIG. 39

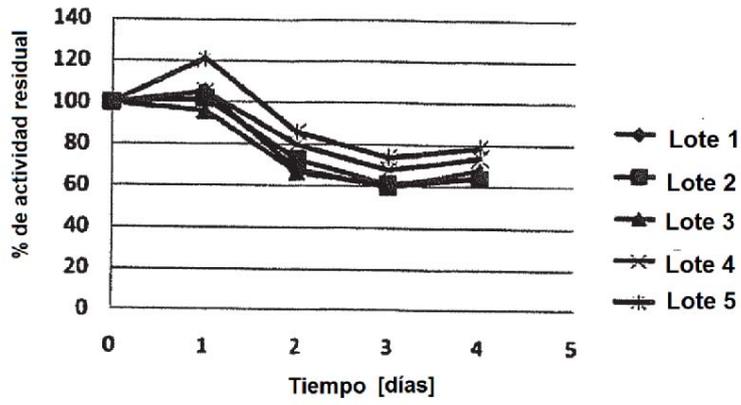


FIG. 40A

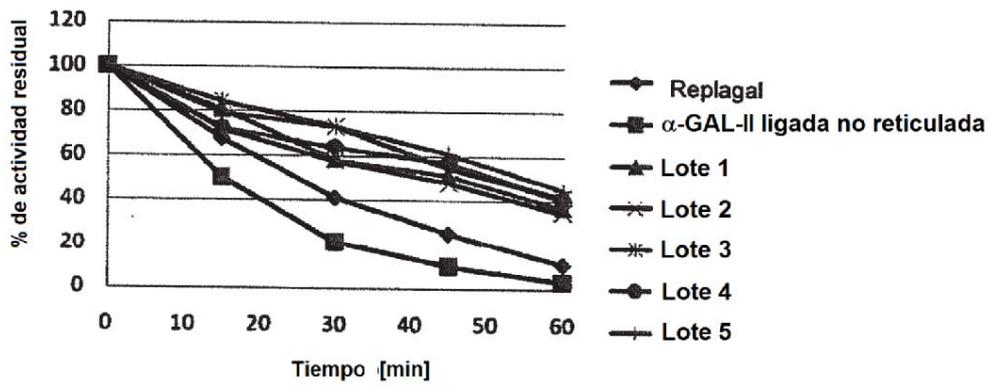


FIG. 40B

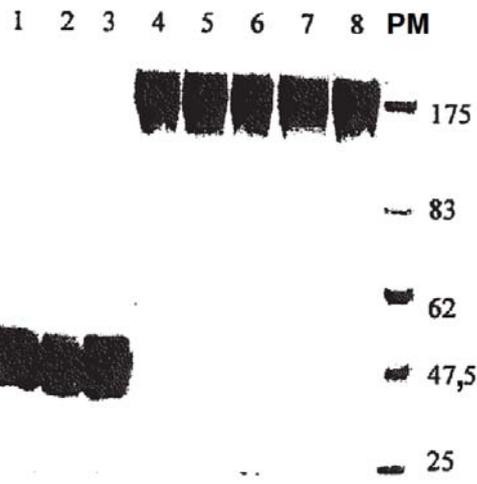


FIG. 41



FIG. 42

FIG. 43A

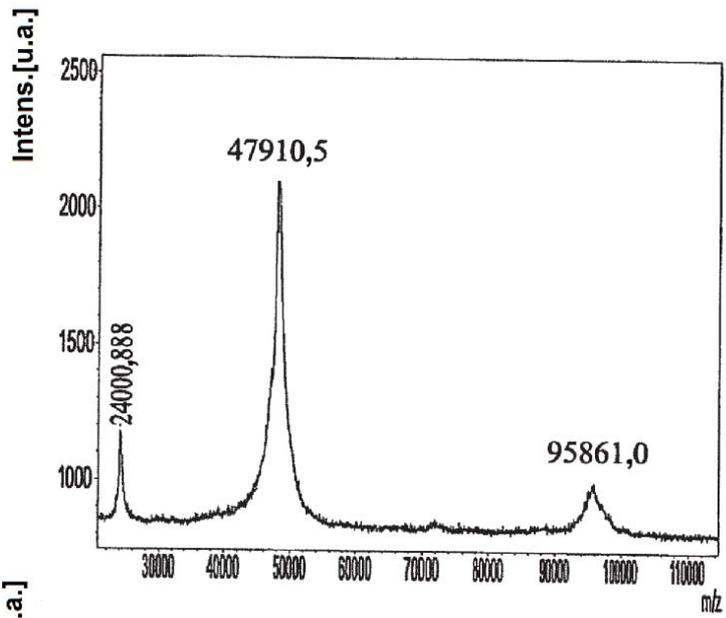


FIG. 43B

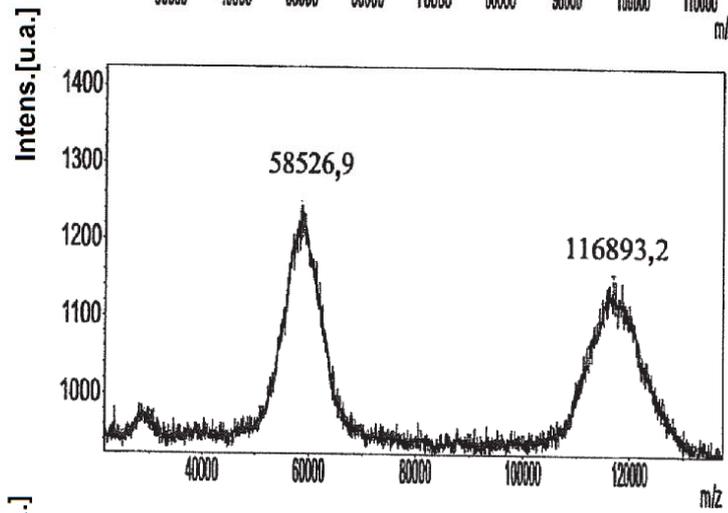


FIG. 43C

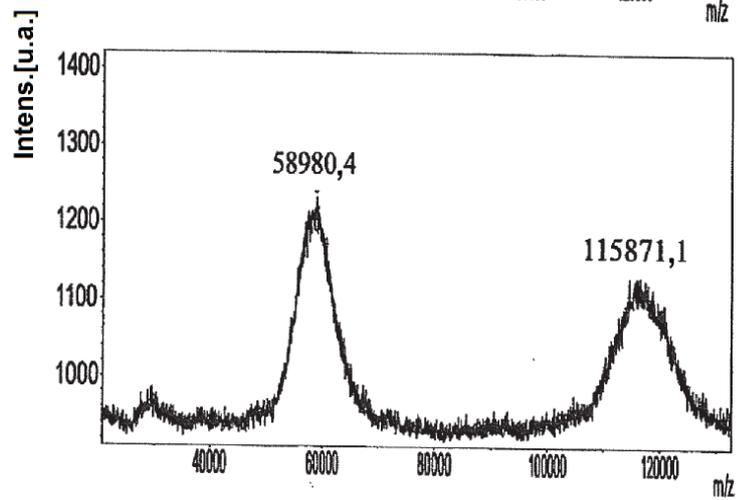


FIG. 43D

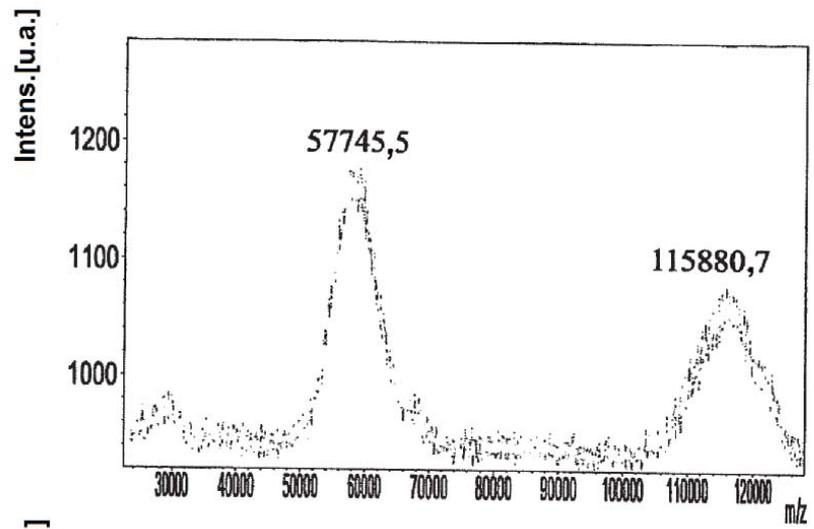


FIG. 43E

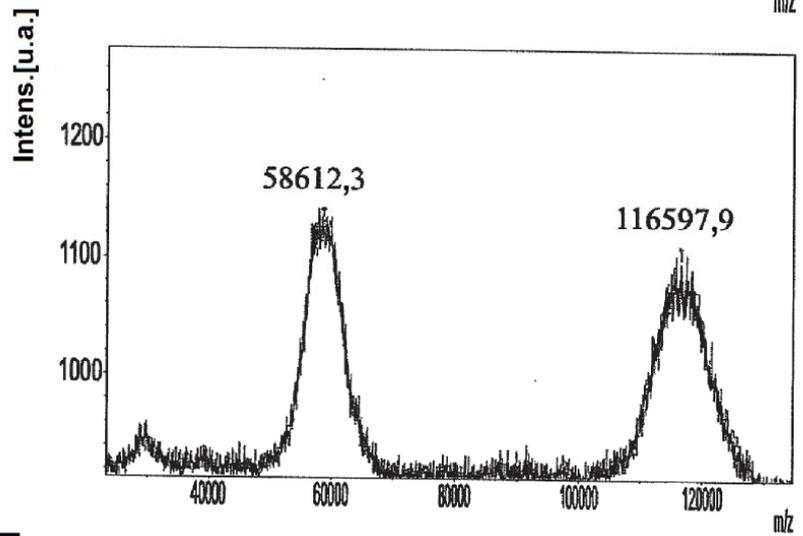
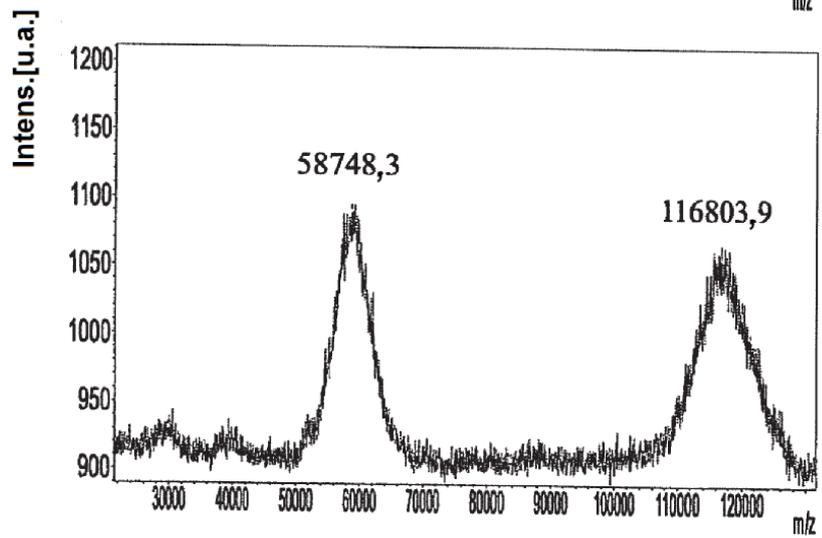


FIG. 43F



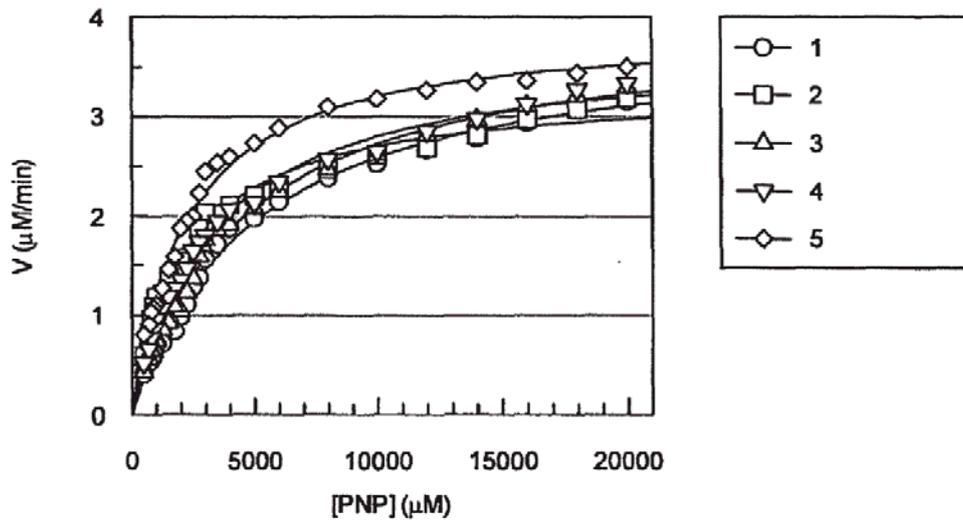


FIG. 44