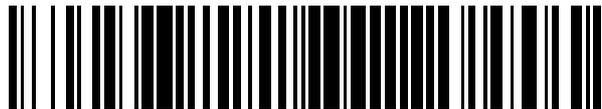


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 997**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/65</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/24</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/47</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2013 E 16182420 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3115372**

54 Título: **Proteínas de fusión terapéuticas dirigidas de enzima lisosómica y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**27.11.2012 US 201261730378 P**  
**15.03.2013 US 201361788968 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2019**

73 Titular/es:

**BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)**  
**105 Digital Drive**  
**Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**AOYAGI-SCHARBER, MIKA;**  
**CHRISTIANSON, TERESA MARGARET;**  
**DVORAK-EWELL, MELITA;**  
**WENDT, DANIEL;**  
**LONG, SHINONG;**  
**LEBOWITZ, JONATHAN y**  
**GOLD, DANIEL SOLOMON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 729 997 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión terapéuticas dirigidas de enzima lisosómica y usos de las mismas

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a proteínas de fusión terapéuticas útiles para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico y a métodos para tratar dichas enfermedades. Las proteínas de fusión terapéuticas comprenden enzima lisosómica, un resto de direccionamiento a lisosomas, por ejemplo, un péptido de IGF-II y un péptido espaciador. Se contempla que la enzima lisosómica sea alfa-N-acetilglucosaminidasa (Naglu) y la enfermedad sea mucopolisacaridosis de tipo IIIB (síndrome de Sanfilippo B).

## Antecedentes

15 Normalmente, las enzimas lisosómicas de mamífero se sintetizan en el citosol y atraviesan el ER, donde se glucosilan con carbohidratos de tipo unidos en N altos en manosa. En el Golgi, el carbohidrato alto en manosa se modifica sobre las enzimas lisosómicas mediante la adición de manosa-6-fosfato (M6P) que dirige estas proteínas al lisosoma. Las proteínas modificadas con M6P se suministran al lisosoma mediante interacción con uno cualquiera de dos receptores de M6P. La forma más favorable de modificación es cuando se añaden dos M6P a un carbohidrato rico en manosa.

Más de cuarenta enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) están causadas, directa o indirectamente, por la ausencia de una o más enzimas lisosómicas en el lisosoma. Se está persiguiendo activamente una terapia de reemplazo enzimático para las EAL. La terapia generalmente requiere que las proteínas de EAL se capten y suministren a los lisosomas de una variedad de tipos celulares de un modo dependiente de M6P. Una posible estrategia implica purificar una proteína de EAL y modificarse para que incorpore un resto de carbohidrato con M6P. Este material modificado puede captarse por las células de manera más eficaz que las proteínas de EAL no modificadas debido a la interacción con los receptores de M6P en la superficie celular.

30 Los inventores de la presente solicitud han desarrollado con anterioridad una tecnología de direccionamiento a base de péptidos que permite un suministro más eficaz de enzimas terapéuticas a los lisosomas. Esta tecnología patentada se denomina direccionamiento lisosómico independiente de glucosilación (GILT, por sus siglas en inglés) debido a que un marcador peptídico reemplaza a M6P como resto que se dirige a los lisosomas. Se describen detalles de la tecnología GILT en las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos n.º 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 2005-0281805, 2005-0244400 y en las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077.

## Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona composiciones y métodos mejorados adicionales para dirección lisosómica eficaz basada en la tecnología de GILT. Entre otras cosas, la presente invención proporciona composiciones para dirigir enzimas lisosómicas a lisosomas usando péptidos de dirección lisosómica. La presente invención también proporciona composiciones para dirigir enzimas lisosómicas a lisosomas usando un péptido de dirección lisosómica que tiene afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de IGF-I y/o afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina, y/o es resistente a escisión de furina. La presente invención también proporciona proteínas de fusión de enzimas lisosómicas que comprenden una enzima lisosómica e IGF-II y péptidos espaciadores que posibilitan producción y captación mejoradas en lisosomas de la proteína de fusión de enzima lisosómica. En determinadas realizaciones, la enzima lisosómica es alfa-N-acetilglucosaminidasa (Naglu).

50 En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende una enzima lisosómica, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador entre la enzima lisosómica y el marcador peptídico de IGF-II. El péptido espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51), y opcionalmente comprende además una o más de (i) GAP (SEQ ID NO: 9), (ii) GGGGS (SEQ ID NO: 12), (iii) GGGS (SEQ ID NO: 16), (iv) AAAAS (SEQ ID NO: 17), (v) AAAS (SEQ ID NO: 18), (vi) PAPA (SEQ ID NO: 19), (vii) TPAPA (SEQ ID NO: 20), (viii) AAAKE (SEQ ID NO: 21) o (ix) GGGGA (SEQ ID NO: 60).

Las enzimas lisosómicas ejemplares contempladas en el presente documento incluyen las expuestas en la tabla 1.

60 En diversas realizaciones, la proteína de fusión terapéutica diana comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a una proteína de  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa humana (Naglu) (Figura 1, SEQ ID NO: 1), un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador localizado entre la secuencia de aminoácidos de Naglu y el marcador peptídico de IGF-II. El espaciador comprende la secuencia de aminoácidos

GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51) entre los aminoácidos de IGF-II humano maduro y los aminoácidos de Naglu humano.

5 En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un péptido de IGF-II para su uso como marcador peptídico para dirigir el péptido o la proteína de fusión que comprende el péptido a un lisosoma de mamífero. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona una muteína de IGF-II. En diversas realizaciones, la invención proporciona una muteína de IGF-II resistente a furina que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro (AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE) (SEQ ID NO: 10 5) y una mutación que suprime al menos un sitio de escisión de la proteasa furina.

15 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una muteína de IGF-II que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, el marcador peptídico de IGF-II comprende los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano. En diversas realizaciones, la muteína de IGF-II comprende una mutación que reduce o disminuye la afinidad de unión por el receptor de insulina en comparación con el IGF-II humano de tipo silvestre.

20 En algunas realizaciones, la muteína de IGF-II tiene afinidad de unión reducida por el receptor de IGF-II en relación con la afinidad de IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I.

25 En diversas realizaciones, la presente invención proporciona una proteína de fusión terapéutica dirigida que contiene una enzima lisosómica; y una muteína de IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro, en donde la muteína de IGF-II es resistente a la escisión por furina y se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una proteína de fusión terapéutica dirigida que contiene una enzima lisosómica; y una muteína de IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y que tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina en relación con la afinidad de un IGF-II humano de origen natural por el receptor de insulina. En una realización relacionada, la muteína de IGF-II es resistente a la escisión por furina y se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

35 En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II adecuada para la invención incluye una mutación con una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de IGF-II humano maduro. En algunas realizaciones, una muteína de IGF-II adecuada para la invención incluye una mutación con una región correspondiente a los aminoácidos 34-40 de IGF-II humano maduro, de tal forma que la mutación suprime al menos un sitio de escisión de la proteasa furina. En algunas realizaciones, una mutación adecuada es una sustitución, eliminación y/o inserción de aminoácidos. En algunas realizaciones, la mutación es una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Arg37 o 40 Arg40 de IGF-II humano maduro. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de Lys o Ala.

45 En algunas realizaciones, una mutación adecuada es una eliminación o reemplazo de restos de aminoácido correspondientes a posiciones seleccionadas entre el grupo que consiste en 30-40, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40 de IGF-II humano maduro y combinaciones de los mismos.

50 En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención contiene además una eliminación o un reemplazo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 2-7 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención incluye además una eliminación o un reemplazo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 1-7 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención contiene además una eliminación o un reemplazo de aminoácidos correspondiente a las posiciones 62-67 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención contiene además una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Tyr27, Leu43 o Ser26 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención contiene al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en Tyr27Leu, Leu43Val, Ser26Phe y combinaciones de las mismas. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención contiene los aminoácidos correspondientes a las posiciones 48-55 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de acuerdo con la invención contiene al menos tres aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 8, 48, 55 49, 50, 54 y 55 de IGF-II humano maduro. En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II de la invención contiene, en las posiciones correspondientes a las posiciones 54 y 55 de IGF-II humano maduro, aminoácidos que están cada uno sin cargar o cargados negativamente a pH 7,4. En diversas realizaciones, la muteína de IGF-II tiene afinidad de unión reducida por el receptor de IGF-II en relación con la afinidad de IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I. En diversas realizaciones, la muteína de IGF-II es IGF2 Δ8-67 R37A (es decir, los 65 aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro con la Arg en la posición 37 de IGF-II humano maduro sustituida por Ala).

En diversas realizaciones, el marcador peptídico está unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de la enzima lisosómica, por lo tanto, es un marcador N-terminal o un marcador C-terminal, respectivamente. En diversas realizaciones, el marcador peptídico es un marcador C-terminal.

En algunas realizaciones, una enzima lisosómica adecuada para la invención es alfa-N-acetilglucosaminidasa (Naglu) humana (figura 1) o un fragmento funcional o variante de la misma. En algunas realizaciones, una enzima lisosómica adecuada para la invención incluye los aminoácidos 1-743 de alfa-N-acetilglucosaminidasa humana o los aminoácidos 24-743 de alfa-N-acetilglucosaminidasa humana, que carece de una secuencia de señal.

En diversas realizaciones, una proteína de fusión terapéutica dirigida de la invención incluye además un espaciador entre la enzima lisosómica y la muteína de IGF-II. El espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).

En diversas realizaciones, el espaciador comprende una estructura alfa-helicoidal o una estructura rígida.

En diversas realizaciones, el espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos de Gly-Ala-Pro (GAP) (SEQ ID NO: 9), Gly-Pro-Ser (GPS) (SEQ ID NO: 10), o Gly-Gly-Ser (GGS) (SEQ ID NO: 11).

En diversas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión terapéutica dirigida como se describe en las diversas realizaciones anteriores. La presente invención proporciona además diversas células que contienen el ácido nucleico de la invención.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas adecuadas para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión terapéutica dirigida de la invención. Se describen en el presente documento métodos para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico que comprenden la administración a un sujeto que necesite tratamiento de una proteína de fusión terapéutica diana según la invención. En algunas realizaciones, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es mucopolisacaridosis de tipo IIIB (síndrome de Sanfilippo B).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína de fusión terapéutica dirigida que incluye una etapa de cultivar células de mamífero en un medio de cultivo celular, en donde las células de mamífero portan el ácido nucleico de la invención, en particular, como se describe en diversas realizaciones del presente documento; y el cultivo se lleva a cabo en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína de fusión terapéutica diana que incluye una etapa de cultivar células de mamífero deficientes en furina en un medio de cultivo celular, en donde las células deficientes en furina portan un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una enzima lisosómica y una muteína de IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro, en donde la muteína de IGF-II se une con el receptor de manosa-6-fosfato independiente de catión humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato; y en donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica diana.

En diversas realizaciones, se contempla que algunas de las proteínas terapéuticas dirigidas que comprenden un espaciador como se describe en el presente documento muestren expresión aumentada de proteína activa cuando se expresan de manera recombinante en comparación con las proteínas terapéuticas dirigidas que comprenden un péptido espaciador diferente. En diversas realizaciones, también se contempla que las proteínas terapéuticas dirigidas descritas en el presente documento puedan tener una actividad aumentada en comparación con otras proteínas terapéuticas dirigidas del presente documento. Se contempla el uso para experimentación adicional de aquellas proteínas terapéuticas dirigidas que muestren una expresión aumentada de proteína activa y/o que tengan una actividad aumentada en comparación con otras proteínas terapéuticas dirigidas que comprenden un péptido espaciador diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto que comprende una proteína de fusión que comprende una enzima lisosómica, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador localizado entre la secuencia de aminoácidos de enzima lisosómica y el marcador peptídico de IGF-II. El péptido espaciador comprende GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ejemplares contempladas por los métodos del presente documento incluyen aquellas expuestas en la tabla 1. Se contempla que la enfermedad de almacenamiento

lisosómico se trate usando una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende la enzima deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico, también divulgada en la tabla 1.

En diversas realizaciones, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la mucopolisacaridosis de tipo IIIB (síndrome de Sanfilippo B) en un sujeto que comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a una proteína de  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (Naglu) (SEQ ID NO: 1), un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador localizado entre la secuencia de aminoácidos de Naglu y el marcador peptídico de IGF-II. El espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).

En diversas realizaciones, la invención proporciona una composición para su uso en la reducción de los niveles de glucosaminoglucano (GAG) en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo IIIB (síndrome de Sanfilippo B) que comprende una proteína de fusión que comprende i) una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a una proteína de  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (Naglu) humana (SEQ ID NO: 1), ii) un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y iii) un péptido espaciador localizado entre la secuencia de aminoácidos de Naglu y el marcador peptídico de IGF-II.

La secuencia espaciadora comprende los aminoácidos GAPGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).

En diversas realizaciones, el dominio de direccionamiento lisosómico o el marcador peptídico de IGF-II comprende los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro (SEQ ID NO: 2, 4). En diversas realizaciones, el marcador peptídico de IGF-II comprende una mutación en el resto Arg37. En diversas realizaciones, la mutación es una sustitución de arginina por alanina. En diversas realizaciones, el dominio de direccionamiento lisosómico o el marcador peptídico de IGF-II comprende IGF2  $\Delta$ 8-67 R37A.

En diversas realizaciones, la proteína de fusión comprende los aminoácidos 1-743 de Naglu humana (SEQ ID NO: 1, 3). En diversas realizaciones, la proteína de fusión comprende los aminoácidos 24-743 de Naglu humana.

En diversas realizaciones, la cantidad eficaz de proteína de fusión se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1-1 mg/kg, aproximadamente 1-5 mg/kg, aproximadamente 2,5-20 mg/kg, aproximadamente 5-20 mg/kg, aproximadamente 10-50 mg/kg o aproximadamente 20-100 mg/kg de peso corporal del sujeto. En diversas realizaciones, la cantidad eficaz de proteína de fusión es de aproximadamente 2,5-20 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.

En diversas realizaciones, la proteína de fusión se administra por vía intratecal, intravenosa, intramuscular, parenteral, transdérmica o transmucosa. En diversas realizaciones, la proteína de fusión se administra por vía intratecal. En diversas realizaciones, la administración intratecal comprende además opcionalmente la administración de la proteína de fusión por vía intravenosa.

En diversas realizaciones, la administración intratecal comprende introducir la proteína de fusión en un ventrículo cerebral, el área lumbar o la cisterna magna.

En diversas realizaciones, la proteína de fusión se administra bimensualmente, mensualmente, trisemanalmente, bisemanalmente, semanalmente, a diario o a intervalos variables.

En diversas realizaciones, el tratamiento da como resultado la reducción de los niveles de glucosaminoglucano (GAG) en el tejido cerebral. Se contempla además que el tratamiento da como resultado una reducción de los gránulos de almacenamiento lisosómico en el tejido cerebral.

También se contemplan composiciones que comprenden las proteínas de fusión terapéuticas diana como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ilustrativas incluyen las expuestas en la Tabla 1.

Otros elementos, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada a continuación. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se proporciona solamente a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos tienen una finalidad únicamente ilustrativa, no limitante.

La figura 1 representa las secuencias de aminoácidos de una porción de una proteína de fusión terapéutica ejemplar que comprende (A) Naglu y (B) un péptido de IGF-II que comprende los restos 8-67 de IGF-II y que tiene una sustitución de aminoácidos en el resto 37, R37A (Arg37Ala).

5 La figura 2 representa las secuencias de nucleótidos de una porción de una proteína de fusión terapéutica ejemplar que comprende (A) Naglu y (B) un péptido de IGF-II que comprende los restos 8-67 de IGF-II y que tiene una sustitución de aminoácidos en el resto 37, R37A (Arg37Ala).

10 La figura 3 divulga secuencias espaciadoras ejemplares contempladas para su uso en la proteína de fusión terapéutica.

#### Definiciones

15 *Mejorar:* Como se usa en el presente documento, el término "mejorar" significa prevenir, reducir o paliar un estado o una mejora en el estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere, la recuperación completa o la prevención completa de una patología. En algunas realizaciones, la mejora incluye la reducción de los materiales acumulados dentro de los lisosomas de tejidos relevantes para la enfermedad.

20 *Muteína de IGF-II resistente a furina:* Como se usa en el presente documento, la expresión "muteína de IGF-II resistente a furina" se refiere a un péptido a base de IGF-II que contiene una secuencia de aminoácidos alterada que suprime al menos un sitio de escisión de la proteasa furina nativo o cambia una secuencia próxima o adyacente a un sitio de escisión de la proteasa furina nativo, de tal forma que se impide, inhibe, reduce o frena la escisión por furina en comparación con un péptido de IGF-II humano de tipo silvestre. Como se usa en el presente documento, una muteína de IGF-II resistente a furina también se refiere a una muteína de IGF-II que es resistente a la furina.

25 *Sitio de escisión de la proteasa furina:* Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de escisión de la proteasa furina" (también citado como "sitio de escisión de furina" o "secuencia de escisión de furina") se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína que sirve como secuencia de reconocimiento para la escisión por proteasas enzimáticas mediante furina o proteasas similares a la furina. Típicamente, un sitio de escisión de la proteasa furina tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 6), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión se posiciona después del resto de arginina (Arg) carboxilo terminal en la secuencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de furina puede tener un secuencia consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 7), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión se posiciona después del resto de arginina (Arg) carboxilo terminal en la secuencia.

35 *Furina:* Como se usa en el presente documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que pueda reconocer y escindir el sitio de escisión de la proteasa furina, como se ha definido en el presente documento, incluyendo furina o una proteasa similar a furina. La furina también se conoce como enzima de escisión de aminoácidos básicos emparejados (PACE). La furina pertenece a la familia de proproteína convertasa similar a subtilisina. El gen que codifica la furina se conocía como FUR (región cadena arriba de FES).

40 *Células deficientes para furina:* Como se usa en el presente documento, la expresión "células deficientes para furina" se refiere a cualquier célula cuya actividad de proteasa de furina se inhiba, reduzca o elimine. Las células deficientes para furina incluyen células tanto de mamífero como de no mamífero que no producen furina o producen una cantidad reducida de furina o una proteasa furina defectuosa.

45 *Direccionamiento lisosómico independiente de glucosilación:* Como se usa en el presente documento, la expresión "direccionamiento lisosómico independiente de glucosilación" (también citado como "GILT") se refiere al direccionamiento lisosómico que es independiente de manosa-6-fosfato.

50 *Alfa-N-acetilglucosaminidasa humana:* Como se usa en el presente documento, la expresión "alfa-N-acetilglucosaminidasa humana" (también citada como "Naglu") se refiere a una forma precursora (es decir, que contiene la secuencia nativa de péptido de señal de Naglu) o procesada (es decir, que carece de la secuencia nativa de péptido de señal de Naglu) de la forma de tipo silvestre de alfa-N-acetilglucosaminidasa humana o un fragmento funcional o variante de la misma, que es capaz de reducir los niveles de glucosaminoglucano (GAG) en los lisosomas de mamífero o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B). Como se usa en el presente documento, el término "funcional", en el sentido aplicado a Naglu, se refiere a una enzima Naglu que puede captarse por los lisosomas de mamífero y que tiene una actividad enzimática suficiente para reducir el material de almacenaje, es decir, glucosaminoglucano (GAG), en el lisosoma de mamíferos.

60 *Muteína de IGF-II:* Como se usa en el presente documento, la expresión "muteína de IGF-II" se refiere a un péptido a base de IGF-II que contiene una secuencia de aminoácidos alterada. Como se usa en el presente documento, la expresión "muteína de IGF-II resistente a furina" se refiere a un péptido a base de IGF-II que contiene una secuencia de aminoácidos alterada que suprime al menos un sitio de escisión de la proteasa furina nativo o cambia una secuencia próxima o adyacente a un sitio de escisión de la proteasa furina nativo, de tal forma que se impide, inhibe, reduce o frena la escisión por furina en comparación con un péptido de IGF-II humano de tipo silvestre. Como se

usa en el presente documento, una mutefna de IGF-II resistente a la furina también se refiere a una mutefna de IGF-II que es resistente a la furina.

5 *Mejorar, aumentar o reducir:* Como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o los equivalentes gramaticales, indican valores que son en relación con una medida basal, tal como una medida en el mismo individuo antes de iniciar el tratamiento descrito en el presente documento o una medida en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "individuo de control" es un individuo afectado por la misma forma de enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B)) que el individuo que se esté tratando, que tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que se esté tratando (para asegurarse de que sean comparables los estados de la enfermedad en el individuo tratado y en los individuos de control).

15 *Individuo, sujeto, paciente:* Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se refieren a un ser humano o a un sujeto mamífero no humano. El individuo (también citado como "paciente" o "sujeto") que se esté tratando es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o adulto humano) que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo, MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B) (es decir, MPS IIIB de aparición en la infancia, la juventud o la edad adulta o de tipo grave/clásico o atenuado (síndrome de Sanfilippo B)) o que tiene el potencial de desarrollar una enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B)).

20 *Enfermedades de almacenamiento lisosómico:* Como se usa en el presente documento, "enfermedades de almacenamiento lisosómico" se refiere a un grupo de trastornos genéticos que son el resultado de una deficiencia en al menos una de las enzimas (por ejemplo, hidrolasas ácidas) que son necesarias para degradar las macromoléculas en péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos en los lisosomas. Como resultado, los individuos que padecen enfermedades de almacenamiento lisosómico tienen materiales acumulados en los lisosomas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ejemplares se listan en la tabla 1.

25 *Enzima lisosómica:* Como se usa en el presente documento, la expresión "enzima lisosómica" se refiere a una enzima que es capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamífero o que pueden rescatar o mejorar uno o más síntomas de enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas para la invención incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo silvestre como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se listan en la tabla 1.

30 *Espaciador:* Como se usa en el presente documento, el término "espaciador" (también citado como "enlazador") se refiere a una secuencia peptídica ente dos restos de proteína en una proteína de fusión. Normalmente, el espaciador se diseña para que sea flexible o para que interponga una estructura, tal como una alfa-hélice, ente dos restos de proteína. Las secuencias espaciadoras ejemplares se divulgan con más detalle en la descripción detallada.

35 *Cantidad terapéuticamente eficaz:* Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de fusión terapéutica dirigida que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicada a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéuticamente eficaz puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto proporciona una indicación de o percibe un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de fusión o de una composición terapéutica eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso de la aparición de la enfermedad y/o también aminorar la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra normalmente con una pauta posológica que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína de fusión terapéutica concreta, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria adecuada dentro de una pauta posológica eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Asimismo, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o la dosis unitaria) para cualquier paciente concreto puede depender de una serie de factores que incluyen el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico concreto empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, género y dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y/o la tasa de excreción o el metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares tal como se sabe bien en la práctica médica.

40 *Tratamiento:* Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratando") se refiere a cualquier administración de una proteína de fusión o composición farmacéutica terapéutica que comprenda dicha proteína de fusión terapéutica que alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa la aparición de, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de manera parcial o completa de uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección concreta. Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o para un sujeto que muestra únicamente signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Como alternativa o además, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos de la

enfermedad, trastorno y/o afección relevante. Por ejemplo, el tratamiento puede referirse a la mejora del estado cardíaco (por ejemplo, aumento de los volúmenes diastólico final y/o sistólico final o reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva que normalmente se encuentra en, por ejemplo, la enfermedad de Pompe) o de la función pulmonar (por ejemplo, capacidad vital durante el llanto frente a la capacidad basal y/o normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejora en el neurodesarrollo y/o las capacidades motoras (por ejemplo, aumento en la puntuación de AIMS); reducción de los niveles de almacenamiento (por ejemplo, glucosaminoglucano (GAG)) en tejidos del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye la mejora de la eliminación de glucosaminoglucano (GAG), en particular, una reducción o prevención de los síntomas neuronales asociados con la MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B).

Tal como se usa en la presente divulgación, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier numeral usado en la presente solicitud usado con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquier fluctuación normal apreciada por un experto habitual en la materia relevante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones mejoradas para dirigirse a enzimas lisosómicas basándose en la tecnología de direccionamiento lisosómico independiente de glucosilación (GILT). Entre otras cosas, la presente invención proporciona muteínas de IGF-II que son resistentes a la furina y/o que tienen una afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina y/o tienen afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de IGF-I y proteínas de fusión terapéuticas dirigidas que contienen una muteína de IGF-II de la invención. La presente invención también proporciona métodos para producir y usar las mismas.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las secciones siguientes. No se pretende que el uso de secciones limite la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa.

*Enzimas lisosómicas*

Una enzima lisosómica adecuada para la invención incluye cualquier enzima que sea capaz de reducir los materiales acumulados en los lisosomas de mamífero o que puedan rescatar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo silvestre como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes o sintéticos o purificarse a partir de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se listan en la tabla 1.

Tabla 1. Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

A. Trastornos de la glucogenosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Pompe	$\alpha$ 1,4-glucosidasa ácida	Oligosacáridos de glucógeno unidos en $\alpha$ 1-4
B. Trastornos por glucolipidosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Gangliosidosis de GM1	$\beta$ -galactosidasa	Gangliósidos GM <sub>1</sub>
Enfermedad de Tay-Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa A	Gangliósido GM <sub>2</sub>
Gangliosidosis de GM2: Variante AB	Proteína activadora de GM <sub>2</sub>	Gangliósido GM <sub>2</sub>
Enfermedad de Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa A y B	Gangliósido GM <sub>2</sub>
Enfermedad de Fabry	$\alpha$ -galactosidasa A	Globósidos
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Ari sulfatasa A	Sulfatidas
Enfermedad de Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactocerebrósido
Niemann-Pick, tipos A y B	Esfingomielinasa ácida	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo C	Defecto de esterificación del colesterol	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo D	Desconocido	Esfingomielina
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida	Ceramida
Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida	Ésteres de colesterol
C. Trastornos por mucopolisacáridos		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
C. Trastornos por mucopolisacáridos		
Síndrome de Hurler (MPS IH)	$\alpha$ -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Scheie (MPS IS)	$\alpha$ -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	$\alpha$ -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato sulfatasa	Heparán y dermatán sulfatos
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparano N-sulfatasa	Heparán sulfato

Sanfilippo B (MPS IIIB)	$\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA-glucosaminidasa acetiltransferasa	Heparán sulfato
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
Morquio A (MPS IVA)	Galactosamina-6-sulfatasa	Queratán sulfato
Morquio B (MPS IVB)	$\beta$ -galactosidasa	Queratán sulfato
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B	Dermatán sulfato
Síndrome de Sly (MPS VII)	$\beta$ -glucuronidasa	
D. Trastornos de oligosacáridos/glicoproteínas		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
$\alpha$ -manosidosis	$\alpha$ -manosidasa	Manosa/oligosacáridos
$\beta$ -manosidosis	$\beta$ -manosidasa	Manosa/oligosacáridos
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa	Oligosacáridos de fucosilo
Aspartilglucosaminuria	N-aspartil- $\beta$ -glucosaminidasa	Aspartilglucosamina asparaginas
Sialidosis (mucopolidosis I)	$\alpha$ -neuraminidasa	Oligosacáridos de sialilo
Galactosialidosis (síndrome de Goldberg)	Deficiencia de proteína protectora lisosómica	Oligosacáridos de sialilo
Enfermedad de Schindler	$\alpha$ -N-acetil-galactosaminidasa	
E. Trastornos del transporte de enzimas lisosómicas		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Mucopolidosis II (enfermedad de la célula I)	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Heparán sulfato
Mucopolidosis III (pseudopolidistofia de Hurler)	Igual que ML II	
E. Trastornos del transporte de la membrana lisosómica		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Cistinosis	Proteína de transporte de cistina	Cistina libre
Enfermedad de Salla	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico libre y ácido glucurónico
Enfermedad por almacenamiento de ácido siálico infantil	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico libre y ácido glucurónico
G. Otros		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Batten (lipofuscinosis ceroides neuronal juvenil)	Desconocido	Lipofuscinas
G. Otros		
Lipofuscinosis ceroides neuronal infantil	Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscinas
Lipofuscinosis ceroides neuronal infantil tardía	Tripeptidil peptidasa I	Lipofuscinas
Mucopolidosis IV	Desconocido	Gangliósidos y ácido hialurónico
Prosaposina	Saposinas A, B, C o D	

- 5 En algunas realizaciones, una enzima lisosómica contemplada en el presente documento incluye una secuencia de polipéptido que tiene un 50-100%, incluyendo un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%, de identidad de secuencia respecto de la secuencia de polinucleótido de origen natural de una enzima humana mostrada en la tabla 1, mientras que sigue codificando una proteína que es funcional, es decir, capaz de reducir los materiales acumulados, por ejemplo, glucosaminoglucono (GAG), en lisosomas de mamífero o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.
- 10 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de enzima lisosómica se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia de enzima humana de origen natural, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el
- 15 porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.
- 20 Preferentemente, se usa el programa informático WU-BLAST-2 para determinar la identidad de secuencia de aminoácidos (Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996)). WU-BLAST-2 usa diversos parámetros

de búsqueda, la mayoría de los cuales se configuran a los valores por defecto. Los parámetros ajustables se fijan con los siguientes valores: lapso de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral de palabra (T)=11. La puntuación HSP (S) y los parámetros HSP S2 son valores dinámicos y los establece solo el programa, dependiendo de la composición de la secuencia particular, sin embargo, los valores mínimos pueden ajustarse y se fijan como se ha indicado anteriormente.

#### *Alfa-N-acetilglucosaminidasa*

La alfa-N-acetilglucosaminidasa, Naglu, se produce en forma de una molécula precursora que se procesa en una forma madura. Este proceso se produce generalmente eliminando el péptido de señal de 23 aminoácidos a medida que la proteína entra en el retículo endoplasmático. Típicamente, la forma precursora también se cita como precursor de longitud completa o proteína Naglu de longitud completa, que contiene 743 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Los 23 aminoácidos N-terminales se escinden a medida que la proteína precursora entra en el retículo endoplasmático, dando como resultado una forma madura o procesada. Por lo tanto, se contempla que normalmente no sean necesarios los 23 aminoácidos N-terminales para la actividad de la proteína Naglu. Las secuencias de aminoácidos de la forma madura y de la forma precursora de longitud completa de una proteína Naglu típica de tipo silvestre o de origen natural humana se muestran en la figura 1 y se exponen en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos de la región codificante de Naglu humana se expone en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de ARNm de Naglu humana se describe en el número de referencia de GenBank NM\_000263. En diversas realizaciones, la Naglu es Naglu humana, con la secuencia de señal (aminoácidos 1-743) o sin ella (aminoácidos 24-743).

La Patente de los Estados Unidos n.º 6.255.096 describe que el peso molecular de alfa-N-acetilglucosaminidasa humana purificada (es decir, 82 kDa y 77 kDa) y de la alfa-N-acetilglucosaminidasa de mamífero recombinante producida en células CHO (es decir, 89 kDa y 79 kDa) es mayor que el peso molecular deducido del polipéptido de Naglu (es decir, 70 kDa), lo que sugiere que los polipéptidos purificados y recombinantes se modifican postraduccionalmente. Véase también Weber et al., Hum Mol Genet 5:771-777, 1996.

#### *Mucopolisacaridosis II B (Síndrome de Sanfilippo B)*

Una enfermedad de almacenamiento lisosómico ilustrativa es la mucopolisacaridosis II B (MPS IIIB), también conocida como síndrome de Sanfilippo de tipo B. La MPS IIIB, síndrome de Sanfilippo B, es un trastorno genético recesivo autosómico raro que se caracteriza por una deficiencia de la enzima alfa-N-acetil-glucosaminidasa (Naglu). En ausencia de esta enzima, los glucosaminoglucanos (GAG), por ejemplo, el GAG heparán sulfato y las moléculas de GAG parcialmente degradadas no pueden eliminarse del organismo y se acumulan en lisosomas de diversos tejidos, dando como resultado una disfunción somática progresiva ampliamente diseminada (Kakkis et al., N Engl J Med. 344(3):182-8, 2001). Se ha demostrado que los GAG se acumulan en lisosomas de neuronas y células gliales, con una menor acumulación fuera del cerebro.

Se han identificado cuatro formas distintas de MPS III, denominadas MPS IIIA, B, C y D. Cada una representa una deficiencia en una de las cuatro enzimas implicadas en la degradación del GAG, heparán sulfato (tabla 1). Todas las formas incluyen diversos grados de los mismos síntomas clínicos, incluyendo rasgos faciales toscos, hepatoesplenomegalia, opacidad corneal y deformidades esqueléticas. De manera más destacable, sin embargo, es la pérdida grave y progresiva de capacidades cognitivas, que está vinculada no solo a la acumulación de heparán sulfato en las neuronas, sino también a la consiguiente elevación de los gangliósidos GM2, GM3 y GD2 provocada por la acumulación primaria de GAG (Walkley et al., Ann N Y Acad Sci. 845:188-99,1998).

Un rasgo clínico característico del síndrome de Sanfilippo B es la degeneración del sistema nervioso central (SNC), que da como resultado una pérdida o una incapacidad para alcanzar importantes etapas del desarrollo. El deterioro cognitivo progresivo culmina en demencia y mortalidad prematura. La enfermedad normalmente se manifiesta en niños pequeños y la esperanza de vida de un individuo afectado normalmente no supera el final de la adolescencia o principios de la veintena.

Las enfermedades MPS III tienen síntomas similares que normalmente se manifiestan en niños pequeños. Los niños afectados son aparentemente normales, aunque puede ser perceptible cierto dismorfismo facial leve. La rigidez articular, hirsutismo y el pelo grueso típicos de otras mucopolisacaridosis normalmente no aparecen hasta las etapas finales de la enfermedad. Tras un intervalo inicial sin síntomas, los pacientes presentan normalmente un declive a causa de problemas del desarrollo y/o de conducta, seguidos de un deterioro intelectual progresivo que da como resultado una demencia grave y una enfermedad motora progresiva. La adquisición del habla normalmente es lenta e incompleta. La enfermedad progresa hacia una alteración conductual progresiva que incluye rabietas, hiperactividad, destructividad, comportamiento agresivo, pica y alteraciones del sueño. Debido a que los niños afectados tienen una fuerza y movilidad muscular normal, las alteraciones conductuales son muy difíciles de controlar. En la fase final de la enfermedad, los niños se vuelven cada vez más inmóviles y letárgicos, a menudo necesitan sillas de ruedas y desarrollan dificultades para tragar y crisis epilépticas. La esperanza de vida de un niño afectado normalmente no supera el final de la adolescencia o el inicio de la veintena.

Una enzima alfa-N-acetilglucosaminidasa adecuada para tratar la MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B) incluye una alfa-N-acetilglucosaminidasa humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 o 3) o un fragmento funcional o una variante de secuencia de la misma que sigue pudiendo captarse en los lisosomas de mamíferos e hidrolizar enlaces alfa 1,4 en el resto terminal de N-acetil-D-glucosamina en los oligosacáridos lineales.

5 Puede medirse la eficacia del tratamiento de la MPS IIIB (síndrome de Sanfilippo B) usando proteínas de fusión terapéuticas dirigidas como se describen en el presente documento usando técnicas conocidas en la materia, así como mediante análisis de biomarcadores lisosómicos y neuronales. Se han efectuado experimentos iniciales en animales con supresión génica de Naglu (véase Li et al., Proc Natl Acad Sci USA 96:14505-510, 1999). Los animales con supresión génica para Naglu presentan grandes cantidades de heparán sulfato en el hígado y riñón y una elevación de los gangliósidos en el cerebro.

10 Los ensayos incluyen el análisis de la actividad y la biodistribución de la enzima exógena, la reducción del almacenamiento de GAG en los lisosomas, en particular en células cerebrales y la activación de los astrocitos y la microglía. Los niveles de diversos biomarcadores lisosómicos o neuronales incluyen, pero sin limitación, proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP1), glipicano, gangliósidos, colesterol, subunidad C de ATP sintasa mitocondrial (SCMAS), ubiquitina, P-GSK3b, beta amiloide y P-tau. También se lleva a cabo un análisis de supervivencia y conductual usando técnicas conocidas en el campo.

15 Los experimentos han demostrado que la proteína subunidad C de ATP sintasa mitocondrial (SCMAS) se acumula en los lisosomas de animales con MPS IIIB (Ryazantsev et al., Mol Genet Metab. 90(4): 393-401, 2007). También se ha demostrado que LAMP-1 y GM130 se encuentran elevadas en animales con MPS IIIB (Vitry et al., Am J Pathol. 177(6):2984-99, 2010).

20 En diversas realizaciones, el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico se refiere a una reducción del almacenamiento lisosómico (por ejemplo, de GAG) en diversos tejidos. En diversas realizaciones, el tratamiento se refiere a una reducción del almacenamiento lisosómico en tejidos diana cerebrales, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En determinadas realizaciones, al almacenamiento lisosómico se reduce en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En diversas realizaciones, el almacenamiento lisosómico se reduce al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en comparación con un control.

25 En diversas realizaciones, el tratamiento se refiere a aumentar la actividad enzimática en diversos tejidos. En diversas realizaciones, el tratamiento se refiere a aumentar la actividad enzimática en tejidos diana cerebrales, neuronas de la médula espinal y/o tejidos diana periféricos. En diversas realizaciones, la actividad enzimática aumenta en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más en comparación con un control. En diversas realizaciones, la actividad enzimática aumenta al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más en comparación con un control. En diversas realizaciones, la actividad enzimática aumentada es de al menos aproximadamente 10 nmol/h/mg, 20 nmol/h/mg, 40 nmol/h/mg, 50 nmol/h/mg, 60 nmol/h/mg, 70 nmol/h/mg, 80 nmol/h/mg, 90 nmol/h/mg, 100 nmol/h/mg, 150 nmol/h/mg, 200 nmol/h/mg, 250 nmol/h/mg, 300 nmol/h/mg, 350 nmol/h/mg, 400 nmol/h/mg, 450 nmol/h/mg, 500 nmol/h/mg, 550 nmol/h/mg, 600 nmol/h/mg o más. En diversas realizaciones, la enzima lisosómica es Naglu.

35 *Terapia de reemplazo enzimático*

40 La terapia de reemplazo enzimático (TRE) es una estrategia terapéutica para corregir una deficiencia enzimática infundiendo la enzima ausente en el torrente sanguíneo. A medida que la sangre perfunde los tejidos del paciente, las células captan la enzima y la transportan al lisosoma, donde la enzima actúa eliminando material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia enzimática. Para que la terapia de reemplazo enzimático lisosómico sea eficaz, ha de administrarse la enzima terapéutica a los lisosomas en las células adecuadas donde se manifiesta el defecto de almacenamiento. Los agentes terapéuticos convencionales para el reemplazo enzimático lisosómico se suministran usando carbohidratos unidos de manera natural a la proteína para que se acople a receptores específicos sobre la superficie de las células diana. Un receptor, el receptor M6P independiente de cationes (CI-MPR), es particularmente útil para dirigir las enzimas lisosómicas de reemplazo debido a que CI-MPR está presente sobre la superficie de la mayoría de tipos celulares.

45 Las expresiones "receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR)", "receptor de M6P/IGF-II", "receptor de CI-MPR/IGF-II", "receptor de IGF-II" o "receptor de IGF2", o las abreviaturas de las mismas, se usan de manera intercambiable en el presente documento, haciendo referencia al receptor celular que se une tanto a M6P como a IGF-II.

50

*Terapia combinada para hacer al sujeto tolerante a la terapia de reemplazo enzimático*

Se ha descubierto que durante la administración de agentes, tales como las proteínas recombinantes y otros agentes terapéuticos, un sujeto puede armar una respuesta inmunitaria contra estos agentes, dando lugar a la producción de anticuerpos que se unen a e interfieren con la actividad terapéutica, así como causar reacciones inmunológicas agudas o crónicas. Este problema es más significativo para proteínas terapéuticas, ya que las proteínas son antígenos complejos y en muchos casos, el sujeto es inmunológicamente virgen respecto de los antígenos. Por lo tanto, en ciertos aspectos de la presente invención, puede ser útil hacer que el sujeto que recibe la enzima terapéutica sea tolerante a la terapia de reemplazo enzimático. En este contexto, puede administrarse la terapia de reemplazo enzimático al sujeto en forma de una terapia combinada con un régimen para hacerle tolerante.

La Patente de los Estados Unidos 7.485.314 divulga el tratamiento de trastornos por almacenamiento lisosómico usando inducción de tolerancia inmunitaria. Brevemente, puede ser útil el uso de dicho régimen para hacer tolerante para evitar que el sujeto arme una respuesta inmunitaria contra la terapia de reemplazo enzimático y de este modo reducir o de otro modo hacer que sean ineficaces los potenciales efectos beneficiosos de la terapia de reemplazo enzimático.

En un método, la invención contempla reducir o prevenir una respuesta inmunitaria específica de antígeno clínicamente significativa contra una proteína de fusión terapéutica recombinante, por ejemplo, que comprende Naglu, usada para tratar un trastorno por almacenamiento lisosómico, por ejemplo, mucopolisacaridosis IIB (MPS IIB o síndrome de Sanfilippo B), donde la proteína de fusión se administra por vía intratecal. El método emplea una pauta inicial de 30-60 días de un agente inmunosupresor de linfocitos T, tal como ciclosporina A (CsA) y un agente antiproliferativo, tal como, azatioprina (Aza), combinado con infusiones intratecales semanales de bajas dosis de la enzima, por ejemplo, Naglu. La normalmente fuerte respuesta de IgG a las infusiones semanales de enzima se reduce o previene en gran medida usando un régimen de 60 días de fármacos inmunosupresores, ciclosporina A (CsA) y azatioprina (Aza), combinado con infusiones semanales intratecales o intravenosas de bajas dosis de proteína de fusión que comprende la enzima. Usando dichos regímenes para aumentar la tolerancia, es posible hacer que el sujeto sea tolerante a dosis terapéuticas mayores de la proteína de fusión durante hasta 6 meses sin un aumento en el título de anticuerpo contra Naglu o de hecho, cualquier otra enzima que pudiera usarse para el reemplazo enzimático de una enfermedades de almacenamiento lisosómico. Dichos regímenes para aumentar la tolerancia se han descrito en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.485.314.

*Direccionamiento lisosómico independiente de glucosilación*

Se desarrolló una tecnología de direccionamiento lisosómico independiente de glucosilación (por sus siglas en inglés, GILT, Glycosylation Independent Lysosomal Targeting) para dirigir las enzimas terapéuticas a los lisosomas. Específicamente, la tecnología GILT usa un marcador peptídico en lugar de M6P para acoplar el CI-MPR para el direccionamiento a lisosomas. Típicamente, un marcador de GILT es una proteína, péptido u otro resto que se une al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato. Ventajosamente, esta tecnología imita el mecanismo biológico normal para la captación de enzimas lisosómicas, aunque lo hace de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

Un marcador de GILT preferido procede del factor de crecimiento insulínico II (IGF-II) humano. El IGF-II humano es un ligando de alta afinidad por el CI-MPR, que también se cita como receptor de IGF-II. La unión de enzimas terapéuticas marcadas para GILT al receptor de M6P/IGF-II dirige la proteína al lisosoma por la vía endocítica. Este método tiene numerosas ventajas frente a métodos que emplean glucosilación, incluyendo simplicidad y economía de costes, debido a que una vez que se aísla la proteína, no es necesario hacer modificaciones adicionales.

Puede encontrarse una descripción detallada de la tecnología GILT y del marcador de GILT en las Publicaciones de los Estados Unidos n.º 20030082176, 20040006008, 20040005309 y 20050281805.

*Marcador para GILT resistente a furina*

Durante el transcurso del desarrollo de enzimas lisosómicas marcadas para GILT para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico, se ha evidenciado que el marcador para GILT derivado de IGF-II puede someterse a escisión proteolítica mediante furina durante la producción en células de mamífero (véase la sección de ejemplos). La proteasa furina normalmente reconoce y escinde un sitio de escisión que tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 6), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión se posiciona después del resto de arginina (Arg) carboxilo terminal en la secuencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de furina tiene un secuencia consenso Lys/Arg-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 7), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión se posiciona después del resto de arginina (Arg) carboxilo terminal en la secuencia. Como se usa en el presente documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que pueda reconocer y escindir el sitio de escisión de la proteasa furina, como se ha definido en el presente documento, incluyendo furina o una proteasa similar a furina. La furina también se conoce como enzima escisora de aminoácidos básicos emparejados (por sus siglas en inglés, PACE, paired basic amino acid cleaving enzyme). La furina pertenece a la familia de proproteína convertasa similar a

subtilisina que incluye PC3, una proteasa responsable de la maduración de la proinsulina en células de islote pancreáticas. El gen que codifica la furina se conocía como FUR (región cadena arriba de FES).

A continuación se muestra la secuencia peptídica de IGF-II humano maduro.

5

AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAS **RVSR**↑**RSR**↑GIVEECCFRS

CDLALLETYC ATPAKSE (SEQ ID NO: 5)

10

Tal como se puede observar, el IGF-II humano maduro contiene dos sitios de escisión de furina solapantes potenciales entre los restos 34-40 (en negrita y subrayados). Las flechas se insertan en dos posiciones de escisión por furina potenciales.

15

Los marcadores para GILT modificados que son resistentes a la escisión por furina y que aún mantienen la capacidad para unirse al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato se divulgan en el documento US 20110223147. Específicamente, pueden diseñarse marcadores para GILT resistentes a furina mutando la secuencia de aminoácidos en uno o más sitios de escisión de furina, de tal forma que la mutación suprime al menos un sitio de escisión de furina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un marcador para GILT resistente a furina es una muteína de IGF-II resistente a furina que contiene una mutación que suprime al menos un sitio de escisión de la proteasa furina o cambia una secuencia adyacente al sitio de escisión de la proteasa furina, de tal forma que se impide, inhibe, reduce o frena la escisión por furina en comparación con un péptido de IGF-II de tipo silvestre (por ejemplo, IGF-II maduro humano de tipo silvestre). Típicamente, una mutación adecuada no tiene impacto en la capacidad del marcador para GILT resistente a furina para unirse al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes. En particular, una muteína de IGF-II resistente a furina adecuada para la invención se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato con una constante de disociación de  $10^{-7}$  M o menor (por ejemplo,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  o menor) a pH 7,4. En algunas realizaciones, una muteína de IGF-II resistente a furina contiene una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 (por ejemplo, 30-40, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40) de IGF-II humano maduro. En algunas realizaciones, una mutación adecuada suprime al menos un sitio de escisión de la proteasa furina. Una mutación puede ser sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, puede sustituirse un aminoácido cualquiera dentro de la región correspondiente a los restos 30-40 (por ejemplo, 30-40, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40) de la SEQ ID NO: 5 por cualquier otro aminoácido o eliminarse. Por ejemplo, las sustituciones en la posición 34 pueden afectar al reconocimiento de furina del primer sitio de escisión. La inserción de uno o más aminoácidos adicionales dentro de cada sitio de reconocimiento puede suprimir uno o ambos sitios de escisión de furina. La eliminación de uno o más de los restos en las posiciones degeneradas también puede suprimir ambos sitios de escisión por furina.

20

25

30

35

40

En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II resistente a furina contiene sustituciones de aminoácidos correspondientes a Arg37 o Arg40 de IGF-II humano maduro. En algunas realizaciones, una muteína de IGF-II resistente a furina contiene una sustitución a Lys o Ala en las posiciones Arg37 o Arg40. Son posibles otras sustituciones, incluyendo combinaciones de mutaciones a Lys y/o Ala en ambas posiciones 37 y 40 o sustituciones por aminoácidos distintos de Lys o Ala.

45

En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II adecuada para su uso en el presente documento puede contener mutaciones adicionales. Por ejemplo, puede cambiarse hasta un 30% o más de los restos de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, puede cambiarse hasta un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30% o más de los restos). Por lo tanto, una muteína de IGF-II adecuada para su uso en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos al menos un 70%, incluyendo al menos un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro.

50

55

En diversas realizaciones, una muteína de IGF-II adecuada para su uso en el presente documento se dirige específicamente al CI-MPR. Son particularmente útiles las mutaciones en el polipéptido de IGF-II que dan como resultado una proteína que se une al CI-MPR con alta afinidad (por ejemplo, con una constante de disociación de  $10^{-7}$  M o menos a pH 7,4) mientras que se unen a otros receptores a los que se sabe que IGF-II se une con una afinidad reducida en relación con IGF-II nativo. Por ejemplo, puede modificarse una muteína de IGF-II resistente a furina adecuada para la invención para que tenga afinidad de unión reducida por el receptor de IGF-I en relación con la afinidad de IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I. Por ejemplo, la sustitución de los restos de IGF-II Tyr 27 por Leu, Leu 43 por Val o Ser 26 por Phe reduce la afinidad del IGF-II por el receptor de IGF-I en 94, 56 y 4 veces, respectivamente (Torres et al. (1995) J. Mol. Biol. 248(2):385-401). La eliminación de los restos 1-7 de IGF-II humano dio como resultado una reducción de 30 veces en la afinidad por el receptor de IGF-I humano y un aumento concomitante de 12 veces en la afinidad por el receptor de IGF-II de rata (Hashimoto et al. (1995) J. Biol.

60

Chem. 270(30):18013-8). La estructura de RMN de IGF-II muestra que Thr-7 está ubicado próximo a los restos Phe-48 y Ser-50, así como próximo al puente disulfuro en Cys-9-Cys-47. Se cree que la interacción de Thr-7 con estos restos puede estabilizar el hexapéptido N-terminal flexible necesario para la unión al receptor de IGF-I (Terasawa et al. (1994) EMBO J. 13(23):5590-7). Al mismo tiempo, esta interacción puede modular la unión al receptor de IGF-II. El truncamiento del extremo C-terminal de IGF-II (restos 62-67) también parece reducir la afinidad de IGF-II por el receptor de IGF-I en 5 veces (Roth et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181(2):907-14).

Las superficies de unión por los receptores de IGF-I y de M6P independiente de cationes se encuentran en caras separadas de IGF-II. Basándose en datos estructurales y de mutación, pueden construirse dominios de unión a M6P independiente de cationes que sean sustancialmente más pequeños que IGF-II humano. Por ejemplo, pueden eliminarse o reemplazarse los aminoácidos amino-terminales (por ejemplo, 1-7 o 2-7) y/o los restos carboxilo-terminales 62-67. Adicionalmente, pueden eliminarse o reemplazarse igualmente los aminoácidos 29-40 sin alterar el plegamiento del resto del polipéptido o la unión al receptor de M6P independiente de cationes. Por lo tanto, puede construirse un resto de direccionamiento que incluye los aminoácidos 8-28 y 41-61. Estas series de aminoácidos quizá podrían unirse directamente o separarse por un enlazador. Como alternativa, pueden proporcionarse los aminoácidos 8-28 y 41-61 en cadenas polipeptídicas separadas. Los dominios comparables de insulina, que es homóloga a IGF-II y tiene una estructura terciaria estrechamente relacionada con la estructura de IGF-II, tienen suficiente información estructural para permitir un repliegamiento adecuado en la estructura terciaria adecuada, incluso cuando están presentes en cadenas polipeptídicas separadas (Wang et al. (1991) Trends Biochem. Sci. 279-281). Por lo tanto, por ejemplo, pueden fusionarse a una enzima lisosómica los aminoácidos 8-28 o una variante de sustitución conservativa de los mismos; la proteína de fusión resultante puede mezclarse con los aminoácidos 41-61 o una variante de sustitución conservativa de los mismos y administrarse a un paciente.

También puede modificarse IGF-II para minimizar la unión a proteínas séricas de unión a IGF (Baxter (2000) Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 278(6):967-76) para evitar el secuestro de construcciones de IGF-II/GILT. Una serie de estudios han localizado restos en IGF-II necesarios para la unión a proteínas de unión a IGF. Pueden explorarse construcciones con mutaciones en estos restos respecto de la conservación de la unión de alta afinidad al receptor M6P/IGF-II y respecto de su afinidad reducida por las proteínas de unión a IGF. Por ejemplo, se ha comunicado que el reemplazo de Phe-26 de IGF-II por Ser reduce la afinidad de IGF-II por IGFBP-1 y -6 sin efecto en la unión al receptor de M6P/IGF-II (Bach et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(13):9246-54). También pueden ser ventajosas otras sustituciones, tales como Glu-9 por Lys. Las mutaciones análogas, por separado o en combinación, en una región de IGF-I que está altamente conservada con IGF-II dan como resultado grandes reducciones en la unión a IGF-BP (Magee et al. (1999) Biochemistry 38(48):15863-70).

Una estrategia alternativa es identificar regiones mínimas de IGF-II que puedan unirse con alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II. Los restos que se han visto implicados en la unión de IGF-II al receptor de M6P/IGF-II se agrupan principalmente en una cara del IGF-II (Terasawa et al. (1994) EMBO J. 13(23):5590-7). Aunque normalmente se mantiene la estructura terciaria de IGF-II mediante tres enlaces disulfuro intramoleculares, puede diseñarse un péptido que incorpore la secuencia de aminoácidos en la superficie de unión al receptor de M6P/IGF-II de IGF-II para que se pliegue correctamente y tenga actividad de unión. Dicho péptido de unión mínimo es un dominio de direccionamiento lisosómico altamente preferido. Por ejemplo, un dominio de direccionamiento lisosómico preferido consta de los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano. También son dominios de direccionamiento lisosómico deseables los péptidos diseñados, basados en la región alrededor de los aminoácidos 48-55, que se une al receptor de M6P/IGF-II. Como alternativa, puede explorarse una biblioteca aleatoria de péptidos respecto de su capacidad de unión al receptor de M6P/IGF-II ya sea mediante un ensayo de dos híbridos de levadura o mediante un ensayo de tipo presentación en fagos.

#### *Afinidad de unión al receptor de insulina*

Muchas muteínas de IGF-II, incluyendo muteínas de IGF-II resistentes a furina, descritas en el presente documento tienen una afinidad de unión al receptor de insulina reducida o disminuida. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un marcador peptídico adecuado para la invención tiene una afinidad de unión al receptor de insulina reducida o disminuida en relación con la afinidad de IGF-II humano de origen natural por el receptor de insulina. En algunas realizaciones, los marcadores peptídicos con afinidad de unión al receptor de insulina reducida o disminuida adecuados para la invención incluyen marcadores peptídicos que tienen una afinidad de unión por el receptor de insulina que es más de 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 12 veces, 14 veces, 16 veces, 18 veces, 20 veces, 30 veces, 40fold, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces menor que la de IGF-II humano maduro de tipo silvestre. La afinidad de unión al receptor de insulina puede medirse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. En la sección de ejemplos se describen ensayos de unión ejemplares.

#### *Mutagénesis*

Pueden prepararse muteínas de IGF-II introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ADN de IGF-II o mediante síntesis del polipéptido de IGF-II deseado. Pueden efectuarse variaciones en la secuencia de IGF-II, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y guías para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas,

por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican IGF-II que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de IGF-II en comparación con una secuencia de origen natural de IGF-II humano maduro. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo de una leucina por una serina, es decir, reemplazos conservativos de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos también pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas disímiles, es decir, reemplazos no conservativos de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden encontrarse opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse mediante la producción sistemática de inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes respecto de su actividad en los ensayos *in vivo* o *in vitro* conocidos en la técnica (tales como ensayos de unión al CI-MPR o ensayos de escisión por furina).

También puede emplearse análisis de aminoácidos de barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se encuentran aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido dentro de este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y tiene menos probabilidades de alterar la conformación de cadena principal de la variante. También se prefiere típicamente la alanina debido a que es el aminoácido más común. Además, con frecuencia se encuentra en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. En caso de que la sustitución por alanina no proporcione cantidades suficientes de variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

Las variaciones pueden efectuarse usando métodos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (de sitio dirigido), barrido de alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis de sitio dirigido [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)], la mutagénesis por selección de restricción [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden llevarse a cabo en el ADN clonado para producir muteínas de IGF-II.

#### *Espaciador*

Puede fusionarse un marcador de GILT al extremo N-terminal o C-terminal de una enzima lisosómica. El marcador de GILT puede fusionarse directamente a la enzima lisosómica o puede estar separado de la enzima lisosómica por un enlazador o un espaciador. Normalmente, un enlazador o espaciador de aminoácidos se diseña para que sea rígido, flexible o para que interponga una estructura, tal como una alfa-hélice, ente dos restos de proteína. Un enlazador o espaciador puede ser más largo, tal como 25-50 aminoácidos de longitud o 35-55 aminoácidos de longitud. Debe seleccionarse cuidadosamente el sitio de una unión de fusión para promover el plegamiento adecuado y la actividad de ambos compañeros de fusión y para prevenir la separación prematura de un marcador peptídico de la enzima lisosómica, por ejemplo, alfa-N-acetilglucosaminidasa.

Se han descrito detalladamente construcciones adicionales de proteínas alfa-N-acetilglucosaminidasa marcada para GILT que pueden usarse en los métodos y composiciones de la presente invención en las Publicaciones de los Estados Unidos n.º 20050244400 y 20050281805.

#### *Células*

De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier célula o tipo celular de mamífero susceptible al cultivo celular y a la expresión de polipéptidos, tal como, por ejemplo, células de riñón embrionario humano (HEK) 293, de ovario de hámster chino (CHO), de riñón de mono (COS), HT1080, C10, HeLa, de riñón de cría de hámster (BHK), 3T3, C127, CV-1, HaK, NS/0 y L-929. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, la línea de mieloma de ratón BALB/c (NS0/1, ECACC n.º: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (células COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MCR 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones, la proteína de fusión de la presente invención se produce a partir de líneas celulares de CHO.

La proteína de fusión de la invención también puede expresarse en una serie de células hospedadoras no de mamífero, tales como, por ejemplo, insectos (por ejemplo, Sf-9, Sf-21, Hi5), plantas (por ejemplo, leguminosas, cereales o tabaco), levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*), procariontes (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis* y otros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp) u hongos.

5 En algunas realizaciones, puede producirse una proteína de fusión con o sin un marcador para GILT resistente a furina en células deficientes para furina. Como se usa en el presente documento, la expresión "células deficientes para furina" se refiere a cualquier célula cuya actividad de proteasa de furina se inhiba, reduzca o elimine. Las células deficientes para furina incluyen células tanto de mamífero como de no mamífero que no producen furina o que producen una cantidad reducida o defectuosa de la proteasa furina. Se conocen y encuentran disponibles para los expertos en la materia células deficientes para furina ejemplares, incluyendo, pero sin limitación, células FD11 (Gordon et al (1997) *Infection and Immunity* 65(8):3370-3375), y las células mutantes descritas en Moehring y Moehring (1983) *Infection and Immunity* 41(3):998-1009. Como alternativa, puede obtenerse una célula deficiente para furina exponiendo a las células de mamífero y de no mamífero anteriores a tratamiento de mutagénesis, por ejemplo, irradiación, bromuro de etidio, uridina bromada (BrdU) y otros, preferentemente mutagénesis química y más preferentemente, mutagénesis por sulfonato de etil metano, recuperando las células que sobreviven al tratamiento y seleccionando aquellas células que se observe que son resistentes a la toxicidad de la endotoxina A de *Pseudomonas* (véase Moehring y Moehring (1983) *Infection and Immunity* 41(3):998-1009).

20 En diversas realizaciones, se contempla que algunas de las proteínas terapéuticas dirigidas que comprenden un espaciador como se describe en el presente documento puedan mostrar expresión aumentada de proteína activa cuando se expresan de manera recombinante en comparación con las proteínas terapéuticas dirigidas que comprenden un péptido espaciador diferente. En diversas realizaciones, también se contempla que las proteínas terapéuticas dirigidas descritas en el presente documento puedan tener una actividad aumentada en comparación con otras proteínas terapéuticas dirigidas del presente documento. Se contempla el uso para experimentación adicional de aquellas proteínas terapéuticas dirigidas que muestren una expresión aumentada de proteína activa y/o que tengan una actividad aumentada en comparación con otras proteínas terapéuticas dirigidas que comprenden un péptido espaciador diferente.

### 30 *Administración de proteínas terapéuticas*

De acuerdo con la invención, normalmente se administra al individuo una proteína terapéutica de la invención sola o en composiciones o medicamentos que comprenden la proteína terapéutica (por ejemplo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad), como se describe en el presente documento. Las composiciones pueden formularse con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación ha de ser adecuada para el modo de administración.

40 Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares, tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Si se desea, pueden mezclarse las preparaciones farmacéuticas con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes, saborizantes y/o aromáticas y similares) que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos o interfieren con su actividad. En una realización preferida, se usa un vehículo hidrosoluble adecuado para administración intravenosa.

50 La composición o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o un polvo. La composición también puede formularse en forma de un supositorio, con aglutinantes y vehículos convencionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

60 La composición o medicamento puede formularse de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para su administración a seres humanos. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición para administración intravenosa es normalmente una solución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran tanto por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobrecillo que indica la cantidad de principio activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella para infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril, suero salino o dextrosa/agua. Cuando la

composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o suero salino de tal forma que puedan mezclarse los ingredientes antes de la administración.

5 La proteína terapéutica puede formularse en sus formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres, tales como aquellos procedentes de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y aquellas formadas con grupos carboxilo libres, tales como los derivados de los hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

10 Una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) se administra por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, una proteína terapéutica se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, una proteína terapéutica se administra por administración directa a un tejido diana, tal como el corazón o un músculo (por ejemplo, intramuscular) o al sistema nervioso (por ejemplo, inyección directa en el cerebro; por vía intraventricular; por vía intratecal). En diversas realizaciones, una proteína terapéutica se administra por vía intratecal. Como alternativa, una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) puede administrarse por vía parenteral, transdérmica o transmucosa (por ejemplo, por vía oral o nasal). Se puede usar de manera concurrente más de una vía, si se desea, por ejemplo, se administra una proteína terapéutica por vía intravenosa e intratecal. La administración intravenosa e intratecal concurrente no es necesariamente simultánea, pero puede ser secuencial.

20 Una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) puede administrarse sola o junto con otros agentes, tales como antihistamínicos (por ejemplo, difenhidramina) o inmunosupresores u otros agentes inmunoterapéuticos que contrarrestan los anticuerpos anti-enzima lisosómica marcada para GILT. La expresión "junto con" indica que el agente se administra antes de, aproximadamente al mismo tiempo que o después de la proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica). Por ejemplo, puede mezclarse el agente en una composición que contiene la proteína terapéutica y de este modo se administra de manera contemporánea con la proteína terapéutica; como alternativa, el agente puede administrarse de manera contemporánea, sin mezclar (por ejemplo, mediante infusión intravenosa en Y del agente en la vía intravenosa por la que también se administra la proteína terapéutica, o viceversa). En otro ejemplo, el agente puede administrarse por separado (por ejemplo, sin mezclar), pero en un espacio corto de tiempo (por ejemplo, menos de 24 horas) desde la administración de la proteína terapéutica.

35 La proteína terapéutica (o la composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, una cantidad de dosis que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso de la aparición de la enfermedad y/o también aminorar la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad, como se ha descrito anteriormente). La dosis que será terapéuticamente eficaz para el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y el alcance de los efectos de la enfermedad y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos usando métodos conocidos en la técnica. La dosis precisa que se empleará también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad y debe decidirse de acuerdo con el criterio de un médico experto y según las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales. La cantidad de dosis terapéuticamente eficaz puede ser de, por ejemplo, 45 aproximadamente 0,1-1 mg/kg, aproximadamente 1-5 mg/kg, aproximadamente 2,5-20 mg/kg, aproximadamente 5-20 mg/kg, aproximadamente 20-50 mg/kg o aproximadamente 20-100 mg/kg o aproximadamente 50-200 mg/kg o de aproximadamente 2,5 a 20 mg/kg de peso corporal. Puede variarse con el paso del tiempo la dosis eficaz para un individuo particular (por ejemplo, aumentarse o reducirse), dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en los momentos de enfermedad o estrés físico o en caso de que empeoren los síntomas de la enfermedad, puede aumentarse la cantidad de dosis.

50 La cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica (o la composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica) se administra a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y del alcance de los efectos de la enfermedad y de una manera continua. La administración dentro de un "intervalo", tal como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra de manera periódica (a diferencia de una sola dosis). El intervalo puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica se administra bimensualmente, mensualmente, tres veces al mes, trisemanalmente, bisemanalmente, semanalmente, dos veces a la semana, tres veces a la semana o a diario. El intervalo de administración para un solo individuo no es necesariamente un intervalo fijo, sino que puede variarse con el paso del tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en los momentos de enfermedad o estrés físico o en caso de que empeoren los síntomas de la enfermedad, puede reducirse el intervalo entre dosis.

65 Como se usa en el presente documento, el término "bimensualmente" significa administración una vez por cada dos meses (es decir, una vez cada dos meses); el término "mensualmente" significa administración una vez al mes; el término "trisemanalmente" significa administración una vez por cada tres semanas (es decir, una vez cada tres

semanas); el término "bisemanalmente" significa administración una vez por cada dos semanas (es decir, una vez cada dos semanas); el término "semanalmente" significa administración una vez a la semana; y la expresión "a diario" significa administración una vez al día.

5 La divulgación se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica, como se describe en el presente documento, en un recipiente (por ejemplo, un vial, frasco, bolsa para administración intravenosa, jeringa, etc.) con una etiqueta que contiene instrucciones para la administración de la composición para el tratamiento de la mucopolisacaridosis de tipo IIB (síndrome de Sanfilippo B), tal como mediante los métodos descritos en el presente documento.

10

#### *Administración intratecal de las formulaciones farmacéuticamente aceptables*

En diversas realizaciones, la proteína de fusión enzimática se administra mediante introducción en el sistema nervioso central del sujeto, por ejemplo, en el fluido cefalorraquídeo del sujeto. En determinados aspectos de la invención, la enzima se introduce por vía intratecal, por ejemplo, en el área lumbar o la cisterna magna o por vía intraventricular (o intracerebroventricular) en un espacio ventricular cerebral. Se describen métodos para la administración de una enzima lisosómica por vía intratecal en la Patente de los Estados Unidos 7.442.372.

15

Los expertos en la materia conocen dispositivos que pueden usarse para efectuar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, puede administrarse la terapia usando un depósito Ommaya, que es de uso común para administrar por vía intratecal fármacos contra la carcinomatosis meníngea (Ommaya AK, Lancet 2: 983-84, 1963). Más específicamente, en este método, se inserta un tubo ventricular a través de un agujero formado en el asta anterior y se conecta a un depósito de Ommaya instalado bajo el cuero cabelludo y el depósito se perfora por vía subcutánea para suministrar por vía intratecal la enzima concreta que se esté reemplazando, que se inyecta dentro del depósito. En la patente de los Estados Unidos n.º 6.217.552 se describen otros dispositivos para la administración intratecal de composiciones terapéuticas. Como alternativa, la composición puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una sola inyección o mediante infusión continua. Cabe destacar que la dosis de tratamiento puede estar en forma de administración de una sola dosis o de múltiples dosis.

20

25

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "administración intratecal" incluya el suministro de una composición farmacéutica directamente en el fluido cefalorraquídeo de un sujeto, mediante técnicas que incluyen inyección cerebroventricular lateral (por ejemplo, por vía intracerebroventricular) mediante una trepanación o punción cisternal o lumbar o similares (como se describe en Lazorthes et al. Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery, 143-192 y Omayya et al., Cancer Drug Delivery, 1: 169-179. La expresión "región lumbar" pretende incluir el área entre las vértebras lumbares tercera y cuarta (espalda baja) y, de manera más inclusiva, la región L2-S1 de la columna vertebral. La expresión "cisterna magna" pretende incluir el acceso al espacio alrededor y por debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna vertebral. La expresión "ventrículo cerebral" pretende incluir las cavidades en el cerebro que son continuas respecto del canal central de la médula espinal. Puede lograrse la administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención a cualquiera de los sitios anteriormente mencionados mediante inyección directa de la composición o mediante el uso de bombas de infusión. Para la inyección, las composiciones de la invención pueden formularse en soluciones líquidas, preferentemente, en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón fosfato. Además, la enzima puede formularse en forma sólida y se vuelve a disolver o suspender inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de una inyección embolada o de infusión continua (por ejemplo, usando bombas de infusión) de la enzima.

30

35

40

45

En diversas realizaciones de la invención, la enzima se administra mediante inyección cerebroventricular lateral al interior del cerebro del sujeto. La inyección puede efectuarse, por ejemplo, a través de una trepanación practicada en el cráneo del sujeto. En otra realización, la enzima y/o la formulación farmacéutica se administra a través de una derivación insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección puede efectuarse en los ventrículos laterales, que son mayores, aunque también puede efectuarse la inyección en los ventrículos tercero y cuarto, más pequeños.

50

En diversas realizaciones, las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención se administran por inyección dentro de la cisterna magna o el área lumbar de un sujeto. En otra realización del método de la invención, la formulación farmacéuticamente aceptable proporciona un suministro sostenido, por ejemplo, una "liberación lenta" de la enzima o de otra composición farmacéutica usada en la presente invención, a un sujeto durante al menos una, dos, tres, cuatro semanas o periodos de tiempo más largos después de que se administre la formulación farmacéuticamente aceptable al sujeto.

55

60

En diversas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a uno o más tejidos superficiales o poco profundos del cerebro o la médula espinal. Por ejemplo, en diversas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a uno o más tejidos superficiales o poco profundos del cerebro o la médula espinal. En algunas realizaciones, los tejidos superficiales o poco profundos diana del cerebro o la médula espinal están ubicados a menos de 4 mm de la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos superficiales o poco profundos

65

diana del cerebro se seleccionan entre los tejidos de la piamadre, los tejidos de la banda cerebral cortical, el hipocampo, el espacio de Virchow-Robin, los vasos sanguíneos dentro del espacio de VR, el hipocampo, partes del hipotálamo en la superficie inferior del cerebro, los nervios y tractos ópticos, el bulbo olfatorio y sus proyecciones y combinaciones de los mismos.

5 En algunas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a uno o más tejidos profundos del cerebro o la médula espinal. En algunas realizaciones, los tejidos profundos diana del cerebro o la médula espinal están ubicados a 4 mm (por ejemplo, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm o 10 mm) por debajo (o dentro de) la superficie del cerebro. En algunas realizaciones, los tejidos profundos diana del cerebro incluyen la banda cortical cerebral. En algunas realizaciones, los tejidos profundos diana del cerebro incluyen uno o más del diencefalo (por ejemplo, el hipotálamo, tálamo, pretálamo, subtálamo, etc.), el metencéfalo, los núcleos lentiformes, los ganglios basales, caudados, putamen, amígdala, globus pallidus y combinaciones de los mismos.

15 En diversas realizaciones, un tejido diana o poco profundo diana de la médula espinal contiene piamadre y/o los tractos de la materia blanca. En diversas realizaciones, un tejido profundo diana de la médula espinal contiene la materia gris de la médula espinal y/o células ependimarias. En algunas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a neuronas de la médula espinal.

20 En diversas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a uno o más tejidos del cerebelo. En determinadas realizaciones, los uno o más tejidos diana del cerebelo se seleccionan entre el grupo que consiste en tejidos de la capa molecular, tejidos de la capa celular de Purkinje, tejidos de la capa celular granular, pedúnculos cerebelares y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos (por ejemplo, enzimas) se suministran a uno o más tejidos profundos del cerebelo que incluyen, pero sin limitación, tejidos de la capa celular de Purkinje, tejidos de la capa celular granular, tejido de la materia blanca cerebelar profunda (por ejemplo, profundo en relación con la capa de células granulares) y tejido de los núcleos cerebelares profundos.

25 En diversas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a uno o más tejidos del tallo cerebral. En algunas realizaciones, los uno o más tejidos diana del tallo cerebral incluyen tejido de la materia blanca del tallo cerebral y/o tejido de los núcleos del tallo cerebral.

30 En diversas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a diversos tejidos cerebrales que incluyen, pero sin limitación, materia gris, materia blanca, áreas periventriculares, pira-aracnoides, meninges, neocórtex, cerebelo, tejidos profundos en la corteza cerebral, capa molecular, región caudada/putamen, cerebro medio, regiones profundas del puente de Varolio o la médula y combinaciones de los mismos.

35 En diversas realizaciones, se suministra una proteína de fusión terapéutica a diversas células en el cerebro, incluyendo, pero sin limitación, neuronas, células gliales, células perivasculares y/o células meníngeas. En algunas realizaciones, se suministra una proteína terapéutica a oligodendrocitos de la materia blanca profunda.

40 *Kits para su uso en los métodos de la invención*

Los agentes utilizados en los métodos de la invención pueden proporcionarse en un kit, pudiendo incluir dicho kit instrucciones para su uso. Dicho kit comprenderá una proteína de fusión como se ha descrito en el presente documento que comprende una enzima para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico y un resto de direccionamiento a lisosomas, normalmente en una dosis y forma adecuada para su administración al hospedador. El kit comprenderá normalmente un dispositivo para suministrar la enzima por vía intratecal.

50 También puede proporcionarse un kit para la conjugación de un antígeno, en particular un antígeno polipeptídico, a un resto de alta captación, para generar una composición terapéutica. Por ejemplo, puede proporcionarse un resto, tal como una muteína de IGF-II, conjugado o no a un enlazador adecuado para unir polipéptidos, como se ha descrito anteriormente. El resto de alta captación también pueden proporcionarse en forma no conjugada, en combinación con un enlazador adecuado e instrucciones para su uso.

55 Otro kit puede comprender instrucciones para la administración intratecal de las composiciones terapéuticas de la presente invención, además de las composiciones terapéuticas. Los kits pueden comprender catéteres u otros dispositivos para la administración intratecal de la terapia de reemplazo enzimático que están precargados con las composiciones terapéuticas de la presente invención. Por ejemplo, se contemplan específicamente catéteres precargados con 0,001-0,01 mg, 0,01-0,1 mg, 0,1-1,0 mg, 1,0-10 mg, 10-100 mg o más de una proteína de fusión terapéutica que comprende una enzima lisosómica y un resto de direccionamiento lisosómico, tal como Naglu y muteína de IGF-II, en una formulación farmacéuticamente aceptable. Los catéteres ejemplares pueden ser catéteres de un solo uso que pueden desecharse tras usarlos. Como alternativa, los catéteres precargados pueden ser rellenables y presentarse en kits que tienen cantidades adecuadas de la enzima para rellenar dichos catéteres.

65 La invención se describirá adicional y más específicamente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, los ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no limitantes.



GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO:28),  
 GAPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 29),  
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 30),

GAPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSGA

P (SEQ ID NO: 31),

5 GGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 34),  
 GAPGGGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPSGA P (SEQ ID NO: 35),  
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 36),  
 GAPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 37),  
 10 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 38),  
 GAPGGGGSGGGSGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 39),  
 GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 40),

GAPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGPSG

AP (SEQ ID NO: 41),

15 GGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 42),  
 GAPGGGGSGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPSGGGGSGGGSGGGPSGA P (SEQ ID NO: 43),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 67),  
 GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGAP  
 20 (SEQ ID NO: 68), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGPS  
 (SEQ ID NO: 63), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO:64),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 65),

GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS

GAP (SEQ ID NO:66),

25 GGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 69),  
 GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS GAP (SEQ ID NO: 70),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71),  
 GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 72),  
 GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 73),  
 30 GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 74),  
 GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 75),

GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGPS

GAP (SEQ ID NO: 76),

35 GGGGAGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 77),  
 GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPSG AP (SEQ ID NO: 78),  
 GGGGPAPGPPAPGPAPGPAGGGPS (SEQ ID NO: 87),  
 GAPGGGGPAPGPPAPGPAPGPAGGGPGGAP (SEQ ID NO: 88),  
 GGGGPAPGPPAPGPAPGPAGGGPS (SEQ ID NO: 89) y  
 40 GAPGGGGPAPGPPAPGPAPGPAGGGPGGAP (SEQ ID NO: 90). Se inserta uno cualquiera de estos  
 espaciadores entre Naglu y la muteína de IGF-II, opcionalmente, a través de los sitios de Ascl en las  
 construcciones.

45 En ciertas realizaciones, en caso de usar la secuencia de péptido de señal de la proteína de la matriz extracelular  
 BM-40 (Nischt et al., Eur J. Biochem 200:529-536, 1991), la Naglu en la construcción no comprende su propia  
 secuencia de señal. El espaciador se inserta entre la secuencia de Naglu y la secuencia de la muteína de IGF-II (por  
 ejemplo, IGF2 8-67 R37A). Una secuencia de péptido de señal de BM-40 ejemplar es MRAWIFFLLCLAGRALA  
 (SEQ ID NO: 8). Puede añadirse un péptido de GAP al espaciador para facilitar la clonación y la adición de un sitio  
 50 de clonación de Ascl. En determinadas realizaciones, en caso de que se use la secuencia de péptido de señal de  
 Naglu nativa (Weber et al., Hum Mol Genet 5:771-777, 1996), la Naglu es Naglu de longitud completa y el  
 espaciador se inserta entre la Naglu de longitud completa y la secuencia de la muteína de IGF-II (por ejemplo, IGF2  
 8-67 R37A). Puede añadirse un péptido de GAP al espaciador para facilitar la clonación y la adición de un sitio de  
 clonación de Ascl.

En construcciones ejemplares, la Naglu humana se ha "optimizado por codones" usando la tecnología DNA 2.0. Se contempla que la Naglu comprenda los aminoácidos 1-743 o los aminoácidos 24-743 de Naglu humana. En una construcción ejemplar, el espaciador comprende opcionalmente un espaciador GAP (sitio para la enzima de restricción Ascl usado para clonación) o cualquiera de las siguientes secuencias: EFGGGGSTR (SEQ ID NO: 22), GAP (SEQ ID NO: 9), GGGGS (SEQ ID NO: 12), GPSGSPG (SEQ ID NO: 23), GPSGSPGT (SEQ ID NO: 24), GPSGSPGH (SEQ ID NO: 25), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPST (SEQ ID NO: 26), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSH (SEQ ID NO: 27), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 28), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 29), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 30), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGA P (SEQ ID NO: 31), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 32), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 33), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 34), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGA P (SEQ ID NO: 35), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 36), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 37), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 38), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 39), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 40), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSG AP (SEQ ID NO: 41), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 42), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGA P (SEQ ID NO: 43), GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPGPS (SEQ ID NO: 44), GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPGPSGAP (SEQ ID NO: 45), GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPGS (SEQ ID NO: 46), GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPGSGAP (SEQ ID NO: 47), GGGSPAPTPAPTPAPTPAPTPAGGGPS (SEQ ID NO: 48), GAPGGGSPAPTPAPTPAPTPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 49), GGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPS (SEQ ID NO: 50), GAPGGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51), GGGSAEAAAKEAAAKEAAA KAGGPGS (SEQ ID NO: 52), GAPGGGSAEAAAKEAAAKEAAA KAGGPGSAP (SEQ ID NO: 53), GGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAA KAPSGGG (SEQ ID NO: 54), GAPGGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAA KAPSGGGGAP (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 56), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 57), GGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 58), GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 59), GGGGA (SEQ ID NO: 60), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPST (SEQ ID NO: 61), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH (SEQ ID NO: 62), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 63), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 64), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 65), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS GAP (SEQ ID NO: 66), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 67), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 68), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 69), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS GAP (SEQ ID NO: 70), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 72), GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 73), GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 74), GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 75),

**GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGPS**

**GAP (SEQ ID NO: 76),**

GGGGAGGGGAAAAASGGGPGSGGGGAAAAASGGGPGSGGGGAAAAASGGGPGS (SEQ ID NO: 77), GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGPGSGGGGAAAAASGGGPGSGGGGAAAAASGGGPGS AP (SEQ ID NO: 78), GGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 79), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 80), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 81), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 82),



tampón de elución Q (Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5). Después, se intercambia el tampón de las muestras purificadas usando concentradores de giro centrífugo y se esterilizan por filtración para su almacenamiento.

Construcción, expresión, producción, purificación y formulación de una proteína de fusión de Naglu ejemplar: Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568). Se generó una construcción de ADN que codificaba Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568) mediante métodos de ADN recombinante convencionales. Naglu corresponde a los aminoácidos 1-743 de Naglu humana de longitud completa e IGF-II corresponde a la muteína de IGF-II que comprende los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro con la sustitución de aminoácidos R37A que confiere resistencia a la furina. Se transfectaron células CHOK1SV con la construcción de ADN y se aisló un clon que expresa de manera estable la proteína de fusión de Naglu-IGF-II marcada para GILT como se ha descrito anteriormente.

Las células que expresaban Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568) se cultivaron en un biorreactor y la proteína de fusión de Naglu se purificó del medio de cultivo del siguiente modo. Se ajustó la salinidad de la recogida a NaCl 1 M, después se cargó en una columna de butil Sepharose 4 FF. Se eluyó con gradiente salino la proteína de fusión de Naglu de la columna de butil Sepharose 4 FF, se recogió y se dializó y después se cargó sobre una columna de heparina Sepharose 6 FF. La proteína de fusión de Naglu se recogió en la fracción de flujo pasante y se cargó en una columna Q Sepharose HP. Se eluyó con gradiente salino la proteína de fusión de Naglu de la columna Q Sepharose HP, se concentró y después se refinó mediante cromatografía de exclusión por tamaños preparativa en Sephacryl S300.

Usando este procedimiento de purificación, se produjo una proteína de fusión de Naglu altamente purificada y enzimáticamente activa, Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568). La proteína de fusión de Naglu se formuló a 20 mg/ml en CSF artificial (fosfato de sodio 1 mM, cloruro de sodio 148 mM, cloruro de potasio 3 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM, cloruro de calcio 1,4 mM, pH 7,2).

Construcción, expresión, producción, purificación y formulación de proteínas de fusión de Naglu ejemplares. Se generaron construcciones de ADN que codificaban Naglu-(GGGGA)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 569), Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566), Naglu-Helicoidal-IGF-II (SEQ ID NO: 567) y Naglu-XTEN-IGF-II (SEQ ID NO: 565) mediante métodos de ADN recombinante convencionales. Naglu corresponde a los aminoácidos 1-743 de Naglu humana de longitud completa e IGF-II corresponde a la muteína de IGF-II que comprende los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro con la sustitución de aminoácidos R37A que confiere resistencia a la furina. Los enlazadores Rígido, Helicoidal y de XTEN ejemplares se describen en el ejemplo 1. Se transfectaron células CHOK1SV con las construcciones de ADN y se aislaron los clones que expresaban de manera estable la proteína de fusión de Naglu-IGF-II marcada para GILT como se ha descrito anteriormente.

Las células que expresaban las proteínas de fusión de Naglu-IGF-II se cultivaron en un biorreactor. En ciclos de producción discontinua-alimentada típicos (10~16 días), todas las construcciones de Naglu-IGF-II con los diversos enlazadores alcanzaron títulos por encima de 30 mg/l con una alta viabilidad celular por encima del 80%.

Las proteínas de fusión de Naglu se purificaron del medio de cultivo como se ha descrito anteriormente. Usando este procedimiento de purificación, las proteínas enzimáticamente activas de Naglu sin marcar y las proteínas de fusión de Naglu-IGF-II, tales como Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566), Naglu-Helicoidal-IGF-II (SEQ ID NO: 567), Naglu-XTEN-IGF-II (SEQ ID NO: 565) y Naglu-(GGGGA)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 569) se purificaron hasta una pureza de ~99%, según se determinó mediante HPLC de fase reversa. Las proteínas Naglu sin marcar y de fusión de Naglu purificadas se formularon a 20 mg/ml en CSF artificial (fosfato de sodio 1 mM, cloruro de sodio 148 mM, cloruro de potasio 3 mM, cloruro de magnesio 0,8 mM, cloruro de calcio 1,4 mM, pH 7,2).

Se contempla que las proteínas de fusión como se describen en el presente documento que demuestren mayores niveles de expresión recombinante de proteína activa y/o una actividad enzimática aumentada en comparación con las proteínas de fusión que comprenden un péptido espaciador diferente puedan usarse en experimentación adicional, tal como en ensayos de actividad, ensayos de unión, ensayos de captación y ensayos de actividad *in vivo*, tal como se describe en más detalle a continuación.

### EJEMPLO 3 - ENSAYOS DE ACTIVIDAD

Para determinar la actividad enzimática de las proteínas de fusión de Naglu, se lleva a cabo un ensayo de actividad de Naglu *in vitro* usando un sustrato sintético marcado con fluorescencia.

Los materiales usados en el ensayo incluyen: 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\alpha$ -D-glucosaminida (sustrato de 4MU-NaGlu) (Calbiochem, n.º de cat. 474500) preparado a una concentración final de 20 mM en DMSO al 10% en el tampón de ensayo (acetato de sodio 0,2 M, con o sin 1 mg/ml de BSA y Tween 20 al 0,005%, pH 4,3-4,8) y almacenado a -80°C. La solución madre de 4-metilumbeliferona (patrón de 4-MU) (Sigma, n.º de cat. M1381) se prepara a 10 mM en DMSO y se almacena a -20°C en pequeñas alícuotas. Un control de rhNaglu-His6 (0,5 mg/ml, R&D Systems, n.º de cat. 7096-GH) se diluye a 10  $\mu$ g/ml en Tris 25 mM, NaCl 125 mM, Tween 20 al 0,001%, pH 7,5 y se almacena a -80°C en pequeñas alícuotas.

En una placa de dilución de 96 pocillos transparente (Greiner), se usan diluciones seriadas 2x de patrones en tampón de dilución (PBS 1 x con o sin 1 mg/ml de BSA, Tween 20 al 0,005%, pH 7,4, de 200 µM a 1,563 µM más un blanco. En una placa de dilución transparente, se preparan las muestras en varias diluciones (en tampón de dilución) para asegurar que se encuentran dentro de la curva patrón.

Se transfieren 10 µl de patrones (200 µM a 1,563 µM), control y muestras de trabajo a una placa de poliestireno negra de 96 pocillos no tratada (Costar, n.º de cat. 3915). Se añaden a cada pocillo 75 µl de sustrato (2 mM), seguido de incubación durante 30 minutos a 37°C. Después, se inactiva la reacción mediante la adición de 200 µl de tampón de parada (glicina/NaOH 0,5 M, pH 10,7). Las placas se leyeron en un lector de placas de fluorescencia para 96 pocillos Ex355 Em460 con un corte de 455.

Usando este ensayo, se demostró que las proteínas de fusión de Naglu ejemplares, incluyendo Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568), Naglu-(GGGGA)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 569), Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566), Naglu-Helicoidal-IGF-II (SEQ ID NO: 567) y Naglu-XTEN-IGF-II (SEQ ID NO: 565) tienen actividad enzimática *in vitro*, con actividades específicas frente al sustrato sintético 4MU-Naglu en el intervalo de ~175.000 a ~220.000 nmol/h/mg. La actividad enzimática de las proteínas de fusión de Naglu fue comparable a la de la proteína Naglu no marcada (~190.000 nmol/h/mg). Los datos de actividad enzimática para las proteínas de fusión de Naglu se proporcionan en la tabla 1.

Tabla 2. Actividad de proteínas de fusión de Naglu

Naglu <sup>1</sup>	Enlazador <sup>2</sup>	Act. Esp. <sup>3</sup>	Cl <sub>50</sub> <sup>4</sup>	K <sub>captación</sub> <sup>5</sup>	t <sub>1/2</sub> <sup>5</sup>
Naglu no marcada	-	190.000	-	-	9,7
Naglu-(GGGGS) <sub>4</sub> GGGPS-IGF-II	36	190.000	0,27, 0,23	5,4	ND
Naglu-(GGGGA) <sub>4</sub> GGGPS-IGF-II	71	220.000	0,36	6,3	ND
Naglu-Rígido-IGF-II	51	190.000	0,23	2,4	9,5
Naglu-Helicoidal-IGF-II	55	175.000	0,25	2,3	9,4
Naglu-XTEN-IGF-II	47	170.000	0,24	3,7	ND

<sup>1</sup>Las proteínas Naglu no marcada y de fusión de Naglu se construyeron, expresaron y purificaron como se describe en el ejemplo 2;

los enlazadores Rígido, Helicoidal y de XTEN ejemplares se describen en el ejemplo 1

<sup>2</sup>SEQ ID NO: de enlazadores en las proteínas de fusión de Naglu probadas en los ejemplos 3 a 5

<sup>3</sup>La actividad específica (nmol/h/mg) para las proteínas Naglu se midió como se describe en el ejemplo 3

<sup>4</sup>La Cl<sub>50</sub> para las proteínas Naglu por la unión competitiva a IGF2R se midió como se describe en el ejemplo 4

<sup>5</sup>La K<sub>captación</sub> y t<sub>1/2</sub> para las proteínas Naglu en fibroblastos con MPS-IIIb se midieron como se describe en el ejemplo 5

#### EJEMPLO 4 - ENSAYOS DE UNIÓN

Los ensayos de unión para determinar la unión de las proteínas de fusión de Naglu a los receptores de IGF-I, IGF-II e insulina se llevaron a cabo de manera general como se describe en el documento US 20120213762. Brevemente, se prueba la afinidad de unión de las construcciones de proteína de fusión por el receptor de insulina en un ensayo que mide la competición de insulina biotinilada a insulina unida a la placa. Se lleva a cabo un ensayo de unión al receptor de insulina haciendo competir insulina, IGF-II y proteína de fusión con la unión de insulina biotinilada al receptor de insulina (Insulina-R).

Específicamente, se recubren placas Reacti-Bind con Insulina-R a una concentración de 1 µg/pocillo/100 µl (38,4 nM). Las placas recubiertas se incuban durante una noche a temperatura ambiente, después se lavan 3x con tampón de lavado (300 µl/pocillo). Después, se bloquean las placas con tampón de bloqueo (300 µl/pocillo) durante 1 hora. Las etapas de lavado se repiten y se elimina cualquier resto de solución en las placas. Se mezcla insulina biotinilada a 20 nM con diferentes concentraciones de insulina, IGF-II o proteína de fusión, mediante diluciones seriadas. Se añaden 100 µl de insulina diluida, IGF-II o proteína de fusión de Naglu en insulina-biotina 20 nM en las placas recubiertas y se incuban las placas a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, se lavan las placas 3 veces con tampón de lavado. Se añaden 100 µl de solución de trabajo de estreptavidina-HRP (50 µl de estreptavidina-HRP en 10 ml de tampón de bloqueo) y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añaden 100 µl de solución de trabajo Elisa-Pico que contiene el sustrato quimioluminiscente Elisa-Pico y se mide la quimioluminiscencia a 425 nm.

#### Ensayo de unión competitiva de IGF2R

Para medir la capacidad de las construcciones de proteína de fusión de Naglu para unirse al receptor de IGF-II, se lleva a cabo un ensayo de unión competitiva. Un fragmento del IGFIIR implicado en la unión a IGF-II (dominios 10-13, denominado proteína 1288) se recubre sobre placas de 96 pocillos. Se incuban IGF-II biotinilado con el receptor en presencia de cantidades crecientes de competidores: IGF-II de control (sin biotinilar) o muestra de proteína de fusión (que contiene un marcador epitópico de GILT derivado de IGF-II). El IGF-II biotinilado unido al receptor se

detecta con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato de HRP quimioluminiscente. La capacidad de la proteína de fusión para inhibir la unión de IGF-II biotinilado al IGFIIIR se calcula a partir de las curvas de inhibición y se indica como un valor de  $CI_{50}$  (concentración necesaria para lograr una inhibición de la unión del 50%).

5 Para el ensayo, se recubre con IGFIIIR una placa blanca Reacti-bind (Pierce, n.º de cat. 437111) a razón de 0,5  $\mu\text{g/pocillo}$  en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  (69,6 nM/por pocillo) en tampón de recubrimiento. La placa se sella y se incuba durante una noche a temperatura ambiente. Después, la placa se lava 3X con tampón de lavado, se bloquea con tampón de bloqueo y después se lava de nuevo 3X con tampón de lavado (300  $\mu\text{l/pocillo}$ ).

10 A continuación, se mezcla IGF-II-biotina 8 nM con diferentes concentraciones de competidores (IGF-II (sin biotinar), proteína de referencia o muestras de proteína de fusión de Naglu) y se añaden a una placa recubierta con IGFIIIR en diluciones seriadas 2X.

15 La placa se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido del lavado de la placa 3X con tampón de lavado. Se prepara la estreptavidina-HRP en tampón de bloqueo (dilución 1:200) y se añaden 100  $\mu\text{l/pocillo}$  a la placa. La actividad de unión de IGF-II-biotina se detecta mediante estreptavidina-HRP usando reactivos de Pico-Elisa. Brevemente, se añade la solución de trabajo de Pico-Elisa preparada a cada pocillo (100  $\mu\text{l/pocillo}$ ) y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos con mecido suave y después, se mide la quimioluminiscencia a 425 nm.

20 Se calculan las  $CI_{50}$  de las muestras usando el porcentaje de IGF-II-biotina unido para cada concentración de inhibidor.

25 Usando este ensayo de unión a IGFIIIR competitivo, se demostró que las proteínas de fusión de Naglu ejemplares, incluyendo Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568), Naglu-(GGGGA)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 569), Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566), Naglu-Helicoidal-IGF-II (SEQ ID NO: 567) y Naglu-XTEN-IGF-II (SEQ ID NO: 565) tienen un valor de  $CI_{50}$  de 0,23-0,36 nM. La proteína Naglu no marcada no tuvo unión detectable en este ensayo. Los datos de unión competitiva a IGF2R para las proteínas de fusión de Naglu se proporcionan en la tabla 1.

#### EJEMPLO 5 - ENSAYOS DE CAPTACIÓN

35 Para medir la capacidad de una enzima de enfermedad de almacenamiento lisosómico para entrar en las células por endocitosis mediada por receptor, se lleva a cabo un ensayo de captación que mide la captación enzimática usando el receptor CI-MPR en células de mioblasto de rata L6 o en fibroblastos humanos con MPS IIIB. Se usan manosa-6-fosfato (M6P) e IGF-II como inhibidores para determinar el sitio de unión al receptor CI-MPR. Los datos se recogen para generar una curva de saturación para la captación enzimática y determinar el parámetro cinético,  $K_{\text{captación}}$ , del proceso.

40 Antes del ensayo de captación (24 horas), se siembran células L6 (mioblastos de rata L6, ATCC n.º CRL-1458) o fibroblastos humanos con MPS IIIB a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos (VWR, n.º 62406-183) y se siembran 0,5 ml por pocillo. En la mañana del ensayo, se mezcla la enzima con medio de captación (1 l de DMEM, 1,5 g de bicarbonato sódico, 0,5 g de albúmina sérica bovina, 20 ml de L-glutamina (200 mM (Gibco, n.º 25030-081), 20 ml de HEPES 1 M (Gibco, n.º 1563080)) (final de 20 mM), pH 7,2) en una campana para cultivo tisular. Las cantidades de enzima pueden variar entre 2-500 nM. El volumen final de medio de captación + enzima es de 0,5 ml por pocillo. Se añaden M6P (concentración final de 5 mM) y/o IGF-II (concentración final de 2,4  $\mu\text{M}$  o 18  $\mu\text{g/ml}$ ) a las muestras adecuadas. Para la inhibición de la captación, se añaden 18  $\mu\text{l}$  de solución madre de IGF-II (1 mg/ml, 133,9  $\mu\text{M}$ ) por ml de medio de captación.

50 El medio de crecimiento se aspira de las células y se añaden 0,450 ml de enzima en medio de captación a cada pocillo. Se indica la hora y se devuelve las células a la incubadora durante 18 horas. Se retira la placa de la incubadora y se aspira el tampón de captación de las células. Las placas se lavan 4x mediante la adición de 0,5 ml de PBS de Dulbecco y aspirándolo. Se añaden 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis CellLytic M (Sigma) a las placas y se agitan a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Se retira el lisado de las células y se almacena en una placa de 96 pocillos cubierta con película (VWR) a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que está lista para el ensayo.

55 Para el ensayo enzimático, se añaden 5  $\mu\text{l}$  de cada lisado por duplicado a 15  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción enzimática (por ejemplo, ensayos de Naglu+4MU) en una placa negra de 96 pocillo (VWR) (véase más arriba) y se determinan las unidades de enzima/ml/h en cada lisado.

60 Para el ensayo de lisado de proteína, se ensayan por duplicado 10  $\mu\text{l}$  de cada lisado usando un kit de ensayo de proteína BCA de Pierce de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para medir la absorbancia, se lee la absorbancia a 562 nm con un lector de placas (lector de placas BMG FluoStar Optima) y se determina la concentración en  $\mu\text{g/ml}$ .

65

Para cada carga enzimática, la captación es unidades de actividad enzimática/mg de lisado. Para determinar la captación, se dividen las unidades de enzima/ml entre los  $\mu\text{g/ml}$  de proteína y se multiplica por 1000 (restando la captación de los pocillos de blanco). Los resultados de los ensayos con o sin inhibidores se comparan para determinar la especificidad de captación del receptor.

5 Para las curvas de saturación, se usan 10 concentraciones de carga de enzima en el intervalo de 0,2-100 nM para generar una curva de saturación usando los ensayos descritos anteriormente.

10 Usando este ensayo, se demostró que una proteína de fusión de Naglu, Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568), tenía una  $K_{\text{captación}}$  de 7-9 nM en fibroblastos con MPS-IIIB.

15 Como alternativa, antes del ensayo de captación (24 horas), se siembran células L6 o fibroblastos humanos con MPS IIIB a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por cada 0,5 ml por pocillo en las placas de 24 pocillos. Las muestras de enzima a 1,6~50 nM se preparan en medio de captación: 1 l de DMEM, 1,5 g de bicarbonato sódico, 0,5 g de albúmina sérica bovina, 20 ml de L-glutamina 200 mM y 20 ml de HEPES 1M, pH 7,2. Para la inhibición de la captación, se añaden a las muestras adecuadas M6P (hasta 5,0 mM final) y/o IGF-II (hasta 1,0  $\mu\text{M}$  final).

20 Se aspira el medio de crecimiento de las células y se reemplaza por 0,5 ml de la preparación de enzima en medio de captación por cada pocillo. Después de 4 horas de incubación, se lavaron las placas 2 veces con 0,5 ml de PBS de Duplecco. Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis M-PER (Pierce) a las placas y se agitan a temperatura ambiente durante 10 minutos. El lisado se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que esté listo para el ensayo.

25 Para el ensayo enzimático, se añaden 10  $\mu\text{l}$  de cada lisado por duplicado a la placa negra de 96 pocillos (véase más arriba).

30 Para el ensayo de lisado de proteína, se ensayan por duplicado 10  $\mu\text{l}$  de cada lisado usando un kit de ensayo de proteína BCA de Pierce de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se lee la absorbancia a 562 nm con un lector de placas (lector de placas BMG FluoStar Optima) y se determina la concentración en  $\mu\text{g/ml}$  usando BSA como patrón.

35 Para cada carga enzimática, la captación se expresa como nmol de 4-MU liberados en 30 minutos. Para las curvas de saturación, se usan concentraciones de enzima en el intervalo de 1,6-50 nM para generar una curva de saturación usando los ensayos descritos anteriormente.

40 La estabilidad celular de las proteínas de fusión de Naglu se determinó monitorizando la actividad intracelular de Naglu a lo largo de un periodo de ~8 días. Se trataron fibroblastos humanos con MPS IIIB sembrados a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos (VWR n.º 62406-183) con la proteína de fusión de Naglu a una concentración final de 20 nM durante 4 horas. Después de 4 horas de incubación, se cambió a las células a medio de crecimiento sin proteína de fusión de Naglu. Para cada punto de tiempo (4 horas, 28 horas, 4 días, 6 días y 8 días) se lisaron las células con 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis M-PER (Pierce) a temperatura ambiente durante 10 minutos y se ensayó la actividad enzimática usando un sustrato marcado con 4-MU. Puede ajustarse la reducción de la actividad de Naglu a lo largo del periodo de muestreo de 8 días a una cinética de primer orden para aproximar una semivida celular de la proteína.

45 Usando este ensayo, se demostró que las proteínas de fusión de Naglu ejemplares, incluyendo Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568), Naglu-(GGGGA)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 569), Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566), Naglu-Helicoidal-IGF-II (SEQ ID NO: 567) y Naglu-XTEN-IGF-II (SEQ ID NO: 565) se internalizan en los fibroblastos con MPS IIIB con una  $K_{\text{captación}}$  de ~2,3-6,3 nM. La proteína Naglu no marcada, por el contrario, no se captó por las células en estas condiciones experimentales. Además, la captación observada de la proteína de fusión de Naglu se inhibió mediante IGF-II, pero no por M6P. Tras la captación, se observó que las proteínas de fusión de Naglu ejemplares eran estables, con una semivida estimada de ~9,5 días, basándose en la actividad enzimática (sustrato de 4-MU) en lisados celulares. Los datos de captación y semivida para las proteínas de fusión de Naglu ejemplares se proporcionan en la tabla 1.

## 55 EJEMPLO 6 - ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE NAGLU *IN VIVO*

60 Para determinar la actividad de proteínas de fusión de Naglu *in vivo*, las proteínas de fusión se administran a animales con supresión génica para Naglu (véase Li et al., Proc Natl Acad Sci USA 96:14505-510, 1999). Los animales con supresión génica de Naglu presentan grandes cantidades de heparán sulfato en el cerebro, hígado y riñón, un aumento de la actividad de beta-hexosaminidasa y tinción de proteína de membrana 2 asociada a lisosomas (LAMP-2) en el cerebro y una elevación de gangliósidos en el cerebro.

65 La actividad y la biodistribución de la enzima exógena se determinan después de 4 inyecciones ICV (intracerebroventriculares) a lo largo de un periodo de dos semanas (100  $\mu\text{g}$ /inyección) de Naglu-IGF2 humano recombinante (rh). Se implanta una cánula permanente en el ratón (n=12/gp, 8-12 semanas de edad al inicio) y se ajusta para cubrir a los ratones cuya cánula no se encuentra en el ventrículo. Las mediciones de criterios de

valoración incluyen biodistribución de Naglu, reducción de GAG, por ejemplo, heparán sulfato, el almacenamiento en los lisosomas de células cerebrales y activación de astrocitos y la microglía. Los niveles de diversos biomarcadores lisosómicos o neuronales (Ohmi et al., PLoS One 6:e27461, 2011) medidos en los grupos tratados y de control incluyen, pero sin limitación, proteína de membrana 1 asociada a lisosomas (LAMP-1), LAMP-2, glipicano 5, extremos no reductores específicos de Naglu (NRE) del heparán sulfato, gangliósidos, colesterol, subunidad C de ATP sintasa mitocondrial (SCMAS), ubiquitina, P-GSK3beta, beta amiloide, P-tau (Tau fosforilada), GFAP (activación de astrocitos) y CD68 (activación de la microglía).

Se llevan a cabo experimentos adicionales para determinar la supervivencia y el análisis conductual usando ratones que reciben 4 inyecciones ICV a lo largo de un periodo de dos semanas de rhNaglu-IGF2 (n=12/gp, inicio a los 5 meses de edad, 100 µg/inyección). Los criterios de valoración a medir incluyen el tiempo de supervivencia, actividad en campo abierto, biodistribución de Naglu, reducción de GAG, por ejemplo, heparán sulfato, almacenamiento en lisosomas, niveles de biomarcadores lisosómicos o neuronales, tales como LAMP-1, LAMP-2, glipicano 5, gangliósidos, colesterol, SCMAS, ubiquitina, P-GSK3beta, beta amiloide, P-tau, GFAP y CD68.

Se han desarrollado ratones con supresión génica para Naglu (Naglu -/-) que tienen una mutación en el exón 6 del gen *naglu* (Li et al., Proc Natl Acad Sci USA. 96:14505-10, 1999). Se seleccionó el sitio del exón 6 debido a que este es el sitio de muchas mutaciones en seres humanos. No se detecta actividad de Naglu en ratones homocigotos y hay una actividad de Naglu reducida en los heterocigotos. Los ratones Naglu -/- tienen tiempos de supervivencia reducidos (6 - 12 meses) y pueden tener otros fenotipos funcionales, tales como niveles de actividad reducidos. Se evalúan los efectos de las proteínas de fusión de Naglu en los ratones Naglu -/-.

Se administra a ratones *Naglu* -/- (n=8) y a 8 ratones de control de vehículo *Naglu* -/- (n=8 heterocigotos de la misma camada) 4 dosis ICV (100 µg de Naglu-IGF2/dosis) durante 2 semanas. En el día -2, se anestesia a los ratones y se inserta una cánula el ventrículo lateral izquierdo. Se deja que se recuperen los ratones. En los días 1,5, 10 y 14, se anestesia a los ratones (Benedryl, 5 mg/kg IP) 15 minutos antes de la dosis ICV. La dosis ICV se infunde a través de la cánula, volumen de 5 µl a lo largo de 15 minutos y se deja que se recuperen los ratones. El día 15, se sacrifica a los ratones, se les extrae la sangre y se congela el suero. Se extraen los cerebros y se inyecta colorante para IR en la cánula y se obtienen imágenes de la cánula.

Se llevan a cabo los siguientes ensayos para determinar los efectos de las proteínas de fusión de Naglu: evaluación del peso corporal, obtención de imágenes por IRN para la colocación de la cánula, evaluación de los niveles de Naglu-IGF2, GFAP, LAMP-1 y LAMP-2 en el cerebro usando inmunohistoquímica, ensayo bioquímico para la actividad de Naglu, los niveles y la actividad de β-hexosaminidasa, ensayo SensiPro para detectar extremos no reductores de glucosaminoglucanos acumulados (GAG) específicos para la mucopolisacaridosis de tipo IIB (MPS IIIB) (documento WO 2010/078511A2), niveles de gangliósidos GM3 medidos mediante ensayo bioquímico, así como inmunotinciones para SCMAS, A-beta, glipicano 5, CD68, GFAP y Naglu en la corteza etorrina medial (Li et al., anteriormente citado).

Se espera que el tratamiento eficaz con Naglu-IGF2 de como resultado una reducción en los niveles de LAMP-1, LAMP-2, GFAP, CD68, SCMAS, A-beta, glipicano 5, β-hexosaminidasa, gangliósido GM3 y GAG específicos de MPS-IIIB.

*Eficacia in vivo de proteínas de fusión de Naglu ejemplares en un modelo de ratón de MPS IIIB.* Se administraron cuatro dosis ICV (100 µg/dosis) de proteína de fusión de Naglu-IGF-II, ya sea Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568) o Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566), durante un periodo de dos semanas a ratones Naglu -/- (n=8). Como control, se administró solo vehículo a ratones Naglu -/- (n=8) y a ocho heterocigotos o compañeros de camada de tipo silvestre (n=8). En el día -5, se anestesió a los ratones; se insertó una cánula en el ventrículo lateral izquierdo del cerebro. Se dejó que se recuperasen los ratones. En los días 1,5, 10 y 14, se anestesió a los ratones con isoflurano inhalado. Se administró a cada ratón Benadryl (5 mg/kg IP) 15 minutos antes de la dosis ICV para reducir cualquier potencial liberación de histamina en respuesta al tratamiento con Naglu-IGF-II. La dosis ICV se infundió a través de la cánula implantada, volumen de 5 µl a lo largo de 15-20 minutos y se dejó que se recuperasen los ratones. A los 1, 7, 14 y 28 después de la dosis final, se sacrificó a los ratones. Se extrajeron los cerebros y se dividieron sagittalmente en 5 secciones para su distribución a diversos ensayos.

Se llevaron a cabo los siguientes ensayos para determinar los efectos de la proteína de fusión de Naglu-IGF-II: evaluación inmunohistoquímica de los niveles de Naglu, LAMP-2, GFAP y CD68 en el cerebro, ensayos bioquímicos para la actividad de Naglu y beta-hexosaminidasa, ensayo SensiPro (Deakin et al., Glycobiology 18:483, 2008; Lawrence et al., Nat Chem Biol. 8:197, 2012; Lawrence et al., J Biol Chem. 283:33674, 2008) para detectar el heparán sulfato total y los NRE de heparán sulfato específicos para la mucopolisacaridosis de tipo IIB (MPS-IIIB) (documento WO 2010/078511A2) y tinción de inmunofluorescencia para SCMAS, beta-amiloide (A-beta), p-Tau, P-GSK3beta, glipicano 5, GFAP y CD68 en la corteza etorrina medial (Li et al., anteriormente citado).

Cuando se evaluaron 24 horas después de la dosis final, el tratamiento con las proteínas de fusión Naglu-(GGGGS)<sub>4</sub>GGGPS-IGF-II (SEQ ID NO: 568) o Naglu-Rígido-IGF-II (SEQ ID NO: 566) dio como resultado un aumento notable de la actividad enzimática de Naglu, con una reducción concomitante en la actividad de beta-

hexosaminidasa y de los niveles de heparán sulfato total, los NRE del heparán sulfato específicos para Naglu y de LAMP-2. La enzima Naglu fue fácilmente detectable en los tejidos cerebrales, no solo en la corteza, el hipocampo, el giro dentado y el tálamo, sino también en ubicaciones geográficas distales, incluyendo la amígdala, el córtex periférico y el hipotálamo. También se observaron reducciones significativas en los niveles de CD68, SCMAS, beta-amiloide (A-beta), p-Tau, P-GSK3beta y glicoproteína 5 en los cerebros de Naglu -/- tras el tratamiento con Naglu-IGF-II. La tinción de GFAP no cambió 24 horas después de la última dosis. La inmunohistoquímica demostró la presencia de la enzima Naglu en muchas áreas del cerebro, dentro de las neuronas y las células gliales, localizada junto con LAMP-2.

Los niveles de heparán sulfato, NRE específicos de Naglu y de actividad de beta-hexosaminidasa continuaron reduciéndose a lo largo de los puntos de tiempo de 7, 14 y 28 días después de la última dosis. A los 28 días, todos los análisis se eran iguales o próximos a los valores del ratón de control normal.

#### EQUIVALENTES

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar usando solamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. No se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado a la descripción anterior, sino que en su lugar es como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Debería entenderse que los artículos “un”, “una”, “el” y “la” como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes plurales. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen “o” entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son de otro modo relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o resulte de otro modo evidente a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en o es de otro modo relevante para un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno, o todos, de los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son de otro modo relevantes para un producto o proceso dado. Asimismo, debe entenderse que la invención abarca variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones se introduce en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación básica (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique otra cosa o a menos que resulte evidente para un experto habitual en la materia que surgiría una contradicción o incoherencia. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo de Markush o similar, debe entenderse que también se desvela cada subgrupo de los elementos, y puede retirarse del grupo cualquier elemento (o elementos). Debería entenderse que, en general, cuando se indique que la invención, o aspectos de la invención, comprendan elementos, características, etc. particulares, determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente, en dichos elementos, características, etc. Para mayor simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto en el presente documento de forma específica en cada caso. Debería entenderse también que cualquier realización de la invención, por ejemplo, cualquier realización hallada en la técnica anterior, puede excluirse de forma explícita de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se enumera en la memoria descriptiva.

También debería entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluye más de un acto, el orden de los actos del método no está necesariamente limitado al orden en que se enumeran los actos del método, pero la invención incluye realizaciones en las que el orden está limitado así. Asimismo, cuando las reivindicaciones enumeran una composición, la invención abarca métodos de uso de las composiciones y métodos para realizar la composición. Cuando las reivindicaciones enumeran una composición, debería entenderse que la invención abarca métodos de uso de la composición y métodos de preparación de la composición.

Todas las publicaciones y documentos de patentes citados en la presente solicitud se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si los contenidos de cada publicación o documento de patente individual se incorporaran en el presente documento.

La presente divulgación se describirá ahora en más detalle en los siguientes párrafos numerados:

1. Una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende (a) una enzima lisosómica, (b) un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y (c) un péptido espaciador entre la enzima lisosómica y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos GGGPS (SEQ ID NO: 14) o GGGSP (SEQ ID NO: 15) y opcionalmente además comprende una o más de (i) GAP (SEQ ID NO: 9), (ii) GGGGS (SEQ ID NO: 12), (iii) GGGG (SEQ ID NO: 16), (iv) AAAAS (SEQ ID NO: 17), (v) AAAS (SEQ ID NO: 18), (vi) PAPA (SEQ ID NO: 19), (vii) TPAPA (SEQ ID NO: 20), (viii) AAAKE (SEQ ID NO: 21) o (ix) GGGGA (SEQ ID NO: 60).

2. La proteína de fusión terapéutica dirigida del párrafo 1, en donde el péptido espaciador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 12, 56, 58, 91-94), (GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 36, 95-100), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 101-107), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS-GAP (SEQ ID NO: 37, 108-113), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 114-162), GAP-

GGGPS-(GGGS)n-GAP (SEQ ID NO: 163-169), GAP-(GGGS)n-AAAAS-GGGPS-(GGGS)n-AAAA-GAP (SEQ ID NO: 170-218), GAP-(GGGS)n-PAPAP-(Xaa)n-GAP (SEQ ID NO: 219-267), GAP-(GGGS)n-PAPAPT-(Xaa)n-GAP (SEQ ID NO: 268-316), GAP-(GGGS)n-(Xaa)n-PAPAP-(Xaa)n-(AAAKE)n-(Xaa)n-(GGGS)n-GAP (SEQ ID NO: 544-551), (GGGA)n (SEQ ID NO: 60,79, 81, 317-320), (GGGA)n-GGGPS (SEQ ID NO: 321-326), GAP-(GGGA)n-GGGPS (SEQ ID NO: 327-333), GAP-(GGGA)n-GGGPS-GAP (SEQ ID NO: 334-340), GAP-(GGGA)n-GGGPS-(GGGA)n-GAP (SEQ ID NO: 341-389), GAP-GGGPS-(GGGA)n-GAP (SEQ ID NO: 390-396), GAP-(GGGA)n-AAAAS-GGGPS-(GGGA)n-AAAA-GAP (SEQ ID NO: 397-445), GAP-(GGGA)n-PAPAP-(Xaa)n-GAP (SEQ ID NO: 446-494), GAP-(GGGA)n-PAPAPT-(Xaa)n-GAP (SEQ ID NO: 495-543), GAP-(GGGA)n-(Xaa)n-PAPAP-(Xaa)n-(AAAKE)n-(Xaa)n-(GGGA)n-GAP (SEQ ID NO: 552-559); en donde n es 1 a 7.

3. La proteína de fusión terapéutica dirigida del párrafo 2, en donde n es 1 a 4.

4. La proteína de fusión terapéutica dirigida del párrafo 1, en donde el péptido espaciador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en EFGGGSTR (SEQ ID NO: 22), GAP (SEQ ID NO: 9), GGGGS (SEQ ID NO: 12), GPSGSPG (SEQ ID NO: 25), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPST (SEQ ID NO: 26),

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSH (SEQ ID NO: 27),  
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 28),  
GAPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 29),  
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 30),  
GAPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGA P (SEQ ID NO: 31),  
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 32),  
GAPGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 33),  
GGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 34),  
GAPGGGSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGSPSGGGSGGGSGGGPSGA P (SEQ ID NO: 35),  
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 36),  
GAPGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSPSGAP (SEQ ID NO: 37), GGGSGGGGSAAAAASGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 38), GAPGGGSGGGGSAAAAASGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 39),  
GGGSGGGGSAAAAASGGGSGGGGSAAAAASGGGSGGGGSAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 40),  
GAPGGGSGGGGSAAAAASGGGSGGGGSAAAAASGGGSGGGGSAAAAASGGGSPG AP (SEQ ID NO: 41),  
GGGSGGGGSAAAAASGGGSPSGGGGSAAAAASGGGSPSGGGGSAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 42),  
GAPGGGSGGGGSAAAAASGGGSPSGGGGSAAAAASGGGSPSGGGGSAAAAASGGGPSGA P (SEQ ID NO: 43),  
GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPS (SEQ ID NO: 44),  
GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGSPGAP (SEQ ID NO: 45),  
GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPS (SEQ ID NO: 46),  
GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPSGAP (SEQ ID NO: 47),  
GGGSPAPTPTPAPTAPAGGGS (SEQ ID NO: 48),  
GAPGGSPAPTPTPAPTAPAGGGS (SEQ ID NO: 49),  
GGGSPAPTPTPAPTAPAGGGS (SEQ ID NO: 50), GAPGGSPAPTPTPAPTAPAGGGS (SEQ ID NO: 51),  
GGGSAEAAAKEAAAKEAAKAGGGS (SEQ ID NO: 52), GAPGGSAEAAAKEAAAKEAAKAGGGS (SEQ ID NO: 53), GGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAKAPSGGG (SEQ ID NO: 54),  
GAPGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAKAPSGGGAP (SEQ ID NO: 55),  
GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), GAPGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 57),  
GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 58),  
GAPGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 59), GGGGA (SEQ ID NO: 60),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPST (SEQ ID NO: 61),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH (SEQ ID NO: 62),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 63),  
GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 64),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 65),  
GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS GAP (SEQ ID NO: 66),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 67),  
GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 68),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 69),  
GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGPSGGGAGGGGAGGGPS GAP (SEQ ID NO: 70),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71),  
GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 72),  
GGGAGGGGAAAAASGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 73),  
GAPGGGAGGGGAAAAASGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 74),  
GGGAGGGGAAAAASGGGAGGGGAAAAASGGGAGGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 75),  
GAPGGGAGGGGAAAAASGGGAGGGGAAAAASGGGAGGGGAAAAASGGGPS GAP (SEQ ID NO: 76),  
GGGAGGGGAAAAASGGGPSGGGAAAAASGGGPSGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 77),  
GAPGGGAGGGGAAAAASGGGPSGGGAAAAASGGGPSGGGAAAAASGGGSPG AP (SEQ ID NO: 78),  
GGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 79), GAPGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 80),  
GGGAGGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 81), GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 82),







26. La proteína de fusión terapéutica dirigida de de uno cualquiera de los párrafos anteriores, que además comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 27. Una composición farmacéutica adecuada para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende una proteína de fusión terapéutica dirigida de uno cualquiera de los párrafos anteriores.
28. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión terapéutica dirigida de uno cualquiera de los párrafos anteriores.
- 10 29. Una célula que contiene el ácido nucleico del párrafo 27.
30. Un método para producir una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende una etapa de: cultivar células de mamífero en un medio de cultivo celular, en donde las células de mamífero portan el ácido nucleico párrafo 28; y el cultivo se lleva a cabo en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.
- 15 31. Un método para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende una enzima lisosómica, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador ubicado entre la secuencia de aminoácidos de la enzima lisosómica y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos GGGPS (SEQ ID NO: 14) o GGGSP (SEQ ID NO: 15) y opcionalmente comprende además una o más de (i) GAP (SEQ ID NO: 9), (ii) GGGGS (SEQ ID NO: 12), (iii) GGGG (SEQ ID NO: 16), (iv) AAAAS (SEQ ID NO: 17), (v) AAAS (SEQ ID NO: 18), (vi) PAPA (SEQ ID NO: 19), (vii) TPAPA (SEQ ID NO: 20), (viii) AAAKE (SEQ ID NO: 21) o (ix) GGGGA (SEQ ID NO: 60).
- 20 32. El método del párrafo 31, en donde el péptido espaciador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 12, 56, 58, 91-94), (GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 36, 95-100), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 101-107), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS-GAP (SEQ ID NO: 37, 108-113), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 114-162), GAP-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 163-169), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-AAAAS-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-AAAA-GAP (SEQ ID NO: 170-218), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 219-267), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-PAPAPT-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 268-316), GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-(AAAKE)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 544-551), (GGGGA)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 60, 79, 81, 317-320), (GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 321-326), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 327-333), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS-GAP (SEQ ID NO: 334-340), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS-(GGGGA)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 341-389), GAP-GGGPS-(GGGGA)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 390-396), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-AAAAS-GGGPS-(GGGGA)<sub>n</sub>-AAAA-GAP (SEQ ID NO: 397-445), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 446-494), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-PAPAPT-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 495-543), GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-(AAAKE)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-(GGGGA)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 552-559); en donde n es 1 a 7.
- 30 33. El método del párrafo 32, en donde n es 1 a 4.
- 35 34. Un método para el tratamiento de la mucopolisacaridosis de tipo IIIB (síndrome de Sanfilippo B) en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 % idéntica a una proteína  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (Naglu) humana, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador ubicado entre la secuencia de aminoácidos GAP (SEQ ID NO: 9), GPS (SEQ ID NO: 10) o GGS (SEQ ID NO: 11).
- 40 35. El método del párrafo 34, en donde la secuencia espaciadora comprende los aminoácidos Gly-Pro-Ser (GPS) (SEQ ID NO: 10) entre los aminoácidos de IGF-II humano maduro y los aminoácidos de Naglu humana.
- 45 36. El método de cualquiera de los párrafos 34 a 35, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO: 12), GGGGA (SEQ ID NO: 60) o GGGG (SEQ ID NO: 16).
- 50 37. El método de cualquiera de los párrafos 34 a 36, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos GGGPS (SEQ ID NO: 14) o GGGSP (SEQ ID NO: 15).
- 55 38. El método de cualquiera de los párrafos 34 a 37, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos AAAAS (SEQ ID NO: 17) o AAAS (SEQ ID NO: 18).
- 60 39. El método de cualquiera de los párrafos 34 a 38, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos PAPA (SEQ ID NO: 19) o TPAPA (SEQ ID NO: 20).
- 65 40. El método de cualquiera de los párrafos 34 a 39, en donde el péptido espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos AAAKE (SEQ ID NO: 21).



- GGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 69),  
 GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS GAP (SEQ ID NO: 70),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71), GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGAP  
 (SEQ ID NO: 72),  
 5 GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 73), GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPSGAP  
 (SEQ ID NO: 74), GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGPS (SEQ ID NO:  
 75), GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGPS GAP (SEQ ID NO: 76),  
 GGGGAGGGGAAAAASGGGGPSGGGGAAAAASGGGGPSGGGGAAAAASGGGGPS (SEQ ID NO: 77),  
 GAPGGGGAGGGGAAAAASGGGGPSGGGGAAAAASGGGGPSGGGGAAAAASGGGGPSG AP (SEQ ID NO: 78),  
 10 GGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 79),  
 GAPGGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 80), GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 81),  
 GAPGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 82),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS [o (GGGGA)<sub>g</sub>GGGGS] (SEQ ID NO:  
 83),  
 15 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH [o (GGGGA)<sub>g</sub>GGGPSH] (SEQ ID NO:  
 84),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS [o (GGGGA)<sub>g</sub>GGGGS] (SEQ ID  
 NO: 85),  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH [o (GGGGA)<sub>g</sub>GGGPSH]  
 20 (SEQ ID NO: 86), GGGGPAPGPPAPGPAPGPAGGGPS (SEQ ID NO: 87),  
 GAPGGGGPAPGPPAPGPAPGPAGGGPGGAP (SEQ ID NO: 88), GGGGPAPAPGPAPGPAPAGGGPS (SEQ  
 ID NO: 89) y  
 GAPGGGGPAPAPGPAPGPAPAGGGPGGAP (SEQ ID NO: 90).
- 25 45. El método del párrafo 44, en donde el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre  
 el grupo que consiste en GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 36),  
 GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPS (SEQ ID NO: 44),  
 GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPSGAP (SEQ ID NO: 45),  
 GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPS (SEQ ID NO: 46),  
 30 GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPSGAP (SEQ ID NO: 47),  
 GGGSPAPTPAPTPAPTPAGGGPS (SEQ ID NO: 48),  
 GAPGGSPAPTPAPTPAPTPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 49),  
 GGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPS (SEQ ID NO: 50),  
 GAPGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51),  
 35 GGGSAEAAAKEAAAKEAAKAGGGS (SEQ ID NO: 52), GAPGGSAEAAAKEAAAKEAAAKEAAKAGGPSGAP (SEQ ID  
 NO: 53), GGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAAPSGGG (SEQ ID NO: 54),  
 GAPGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAAPSGGGGAP (SEQ ID NO: 55) y  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71).
- 40 46. El método del párrafo 45, en donde el péptido espaciador comprende una secuencia de aminoácidos  
 seleccionada entre el grupo que consiste en GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 36),  
 GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPSGAP (SEQ ID NO: 47),  
 GAPGGSPAPAPTPAPAPTPAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51),  
 GAPGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAAPSGGGGAP (SEQ ID NO: 55) y  
 45 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71).
47. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 46, en donde la secuencia espaciadora comprende la  
 secuencia de aminoácidos Gly-Ala-Pro (GAP) (SEQ ID NO: 9).
- 50 48. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 47, en donde el marcador peptídico es un marcador N-terminal  
 o un marcador C-terminal.
49. El método del párrafo 48, en donde el marcador peptídico es un marcador C-terminal.
- 55 50. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 49, en donde el espaciador comprende una estructura  
 helicoidal o una estructura rígida.
51. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 50, en donde el dominio de direccionamiento lisosómico  
 comprende los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro.
- 60 52. El método del párrafo 31 a 51, en donde el marcador peptídico de IGF-II comprende una mutación en el resto  
 Arg37.
53. El método del párrafo 52, en donde la mutación es una sustitución de arginina por alanina.
- 65

54. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 53, en donde la proteína de fusión comprende los aminoácidos 1-743 o los aminoácidos 24-743 de Naglu humana (figura 1).
- 5 55. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 54, en donde la cantidad eficaz de proteína de fusión se encuentra en el intervalo de 2,5-20 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.
56. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 55, en donde la proteína de fusión se administra por vía intratecal, que comprende además opcionalmente administrar la proteína de fusión por vía intravenosa.
- 10 57. El método del párrafo 56, en donde la administración comprende introducir la proteína de fusión en un ventrículo cerebral, el área lumbar o la cisterna magna.
58. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 55, en donde la proteína de fusión se administra por vía intravenosa.
- 15 59. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 58, en donde la proteína de fusión se administra bimensualmente, mensualmente, trisemanalmente, bisemanalmente, semanalmente, diariamente o a intervalos variables.
- 20 60. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 59, en donde el tratamiento da como resultado la reducción de los niveles de glucosaminoglucono (GAG) en un tejido cerebral.
61. El método de uno cualquiera de los párrafos 31 a 60, en donde el tratamiento da como resultado la reducción de los gránulos de almacenamiento lisosómico en un tejido cerebral.
- 25

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende (a) una enzima lisosómica, (b) un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y (c) un péptido espaciador entre la enzima lisosómica y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el péptido espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAPAAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).
2. Una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 85% idéntica a una proteína  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador ubicado entre la secuencia de aminoácidos de Naglu y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAPAAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51) entre los aminoácidos de IGF-II humano maduro y los aminoácidos de Naglu humana.
3. La proteína de fusión terapéutica dirigida de la reivindicación 1 o 2, en donde el marcador epitópico comprende los aminoácidos 8-67 de la SEQ ID NO: 5.
4. La proteína de fusión terapéutica dirigida de la reivindicación 1 o 2, en donde el marcador epitópico comprende la SEQ ID NO: 2.
5. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el espaciador consiste en la SEQ ID NO: 51.
6. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador peptídico es un marcador N-terminal o un marcador C-terminal.
7. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador peptídico de IGF-II comprende una mutación en el resto Arg37, opcionalmente en donde la mutación es una sustitución de arginina por alanina.
8. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición farmacéutica adecuada para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende una proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
11. Una célula que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Un método para producir una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende una etapa de: cultivar células de mamífero en un medio de cultivo celular, en donde las células de mamífero portan el ácido nucleico de la reivindicación 10; y el cultivo se lleva a cabo en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.
13. Una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto que comprende una proteína de fusión que comprende una enzima lisosómica, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador ubicado entre la secuencia de aminoácidos de la enzima lisosómica y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el péptido espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAPAAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).
14. Una composición para su uso en el tratamiento de la mucopolisacaridosis de tipo IIB (síndrome de Sanfilippo B) en un sujeto que comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 85% idéntica a una proteína  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (Naglu) humana, un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y un péptido espaciador ubicado entre la secuencia de aminoácidos de Naglu y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el espaciador comprende la secuencia de aminoácidos GAPGGGSPAPAPTAPAPTAPAPAAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).
15. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en donde el marcador peptídico comprende los aminoácidos 8-67 de la SEQ ID NO: 5.

16. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en donde el marcador peptídico comprende los aminoácidos expuestos en la SEQ ID NO: 2.
- 5 17. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en donde el péptido espaciador consiste en la SEQ ID NO: 51
- 10 18. Una composición para su uso en reducir los niveles de glucosaminoglucano en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo IIB (síndrome de Sanfilippo B) que comprende una proteína de fusión que comprende i) una secuencia de aminoácidos al menos un 85% idéntica a una proteína  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (Naglu) humana, ii) un marcador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70% idéntica a los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro y iii) un péptido espaciador ubicado entre la secuencia de aminoácidos de Naglu y el marcador peptídico de IGF-II, en donde el espaciador comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en (GAPGGGSPAPAPTPAPAPTPAPAAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51).
- 15 19. La composición para el uso de la reivindicación 18, en donde el espaciador consiste en los aminoácidos expuestos en la SEQ ID NO: 51.
- 20 20. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, en donde el marcador peptídico comprende los aminoácidos 8-67 de la SEQ ID NO: 5.
- 25 21. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en donde el marcador peptídico es un marcador N-terminal o un marcador C-terminal.
- 30 22. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en donde el dominio de direccionamiento lisosómico comprende los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano maduro.
- 35 23. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en donde el marcador peptídico de IGF-II comprende una mutación en el resto Arg37, opcionalmente en donde la mutación es una sustitución de arginina por alanina.
- 40 24. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, en donde la proteína de fusión comprende los aminoácidos 1-743 o los aminoácidos 24-743 de Naglu humana (figura 1).
- 45 25. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 24, en donde la cantidad eficaz de proteína de fusión se encuentra en el intervalo de 2,5-20 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto.
26. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 25, en donde la proteína de fusión se administra por vía intratecal, que comprende opcionalmente además administrar la proteína de fusión por vía intravenosa, opcionalmente en donde la administración comprende introducir la proteína de fusión en un ventrículo cerebral, área lumbar o cisterna magna.
27. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 25, en donde la proteína de fusión se administra por vía intravenosa.

**Figura 1**

**A. Secuencia de aminoácidos de Naglu (secuencia de señal subrayada) (SEQ ID NO: 1)**

M E A V A V A A A V G V L L L A G A G G A A  
G D E A R E A A A V R A L V A R L L G P G P  
A A D F S V S V E R A L A A K P G L D T Y S  
L G G G G A A R V R V R G S T G V A A A A G  
L H R Y L R D F C G C H V A W S G S Q L R L  
P R P L P A V P G E L T E A T P N R Y R Y Y  
Q N V C T Q S Y S F V W W D W A R W E R E I  
D W M A L N G I N L A L A W S G Q E A I W Q  
R V Y L A L G L T Q A E I N E F F T G P A F  
L A W G R M G N L H T W D G P L P P S W H I  
K Q L Y L Q H R V L D Q M R S F G M T P V L  
P A F A G H V P E A V T R V F P Q V N V T K  
M G S W G H F N C S Y S C S F L L A P E D P  
I F P I I G S L F L R E L I K E F G T D H I  
Y G A D T F N E M Q P P S S E P S Y L A A A  
T T A V Y E A M T A V D T E A V W L L Q G W  
L F Q H Q P Q F W G P A Q I R A V L G A V P  
R G R L L V L D L F A E S Q P V Y T R T A S  
F Q G Q P F I W C M L H N F G G N H G L F G  
A L E A V N G G P E A A R L F P N S T M V G  
T G M A P E G I S Q N E V V Y S L M A E L G  
W R K D P V P D L A A W V T S F A A R R Y G  
V S H P D A G A A W R L L L R S V Y N C S G  
E A C R G H N R S P L V R R P S L Q M N T S  
I W Y N R S D V F E A W R L L L T S A P S L  
A T S P A F R Y D L L D L T R Q A V Q E L V  
S L Y Y E E A R S A Y L S K E L A S L L R A  
G G V L A Y E L L P A L D E V L A S D S R F  
L L G S W L E Q A R A A A V S E A E A D F Y  
E Q N S R Y Q L T L W G P E G N I L D Y A N  
K Q L A G L V A N Y Y T P R W R L F L E A L  
V D S V A Q G I P F Q Q H Q F D K N V F Q L  
E Q A F V L S K Q R Y P S Q P R G D T V D L  
A K K I F L K Y Y P R W V A G S W

**B. Secuencia de aminoácidos de IGFII 8-67 R37A (SEQ ID NO: 2)**

L C G G E L V D T L Q F V C G D R G F Y F S  
R P A S R V S A R S R G I V E E C C F R S C  
D L A L L E T Y C A T P A K S E

**Figura 2**

**A. Secuencia de nucleótidos de Naglu (secuencia de señal subrayada) (SEQ ID NO: 3)**

ATGGAGGCGGTGGCGGTGGCCGCGGCGGTGGGGTCCCTTCTCCTGGCCGGGGCCGGGGGCGCGG  
CAGGCGACGAGGCCCGGGAGGCGGCGGCGGCGTGC GGCGCTCGTGGCCCGGCTGCTGGGGCCAGG  
 CCCC GCGGCCACTTCTCCGTGTCGGTGGAGCGCGCTCTGGCTGCCAAGCCGGGCTTGGACACC  
 TACAGCCTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGTGC GGCTGCCACGTGGCCTGGTCCGGCTCTCA  
 CCGCGGGGCTGCACCGCTACCTGCGCGACTTCTGTGGCTGCCACGTGGCCTGGTCCGGCTCTCA  
 GCTGCGCCTGCCGCGGCCACTGCCAGCCGTGCCGGGGAGCTGACCGAGGCCACGCCAACAGG  
 TACCGCTATTACCAGAATGTGTGCACGCAAAGCTACTCTTTTCGTGTGGTGGGACTGGGCCGCT  
 GGGAGCGAGAGATAGACTGGATGGCGCTGAATGGCATCAACCTGGCACTGGCCTGGAGCGGCCA  
 GGAGGCCATCTGGCAGCGGGTGTACCTGGCCTTGGCCCTGACCCAGGCAGAGATCAATGAGTTC  
 TTTACTGGTCCCTGCCTTCTGGCCTGGGGGCGAATGGGCAACCTGCACACCTGGGATGGCCCC  
 TGCCCCCTCCTGGCACATCAAGCAGCTTTACCTGCAGCACCGGGTCTTGGACCAGATGCGCTC  
 CTTCCGCATGACCCAGTGCTGCCTGCATTGCGGGGCATGTTCCCGAGGCTGTACCAGGGTG  
 TTCCCTCAGGTCAATGTCACGAAGATGGGCAGTTGGGGCCACTTTAACTGTTCTACTCCTGCT  
 CCTTCTTCTGGCTCCGGAAGACCCCATATTCCCATCATCGGGAGCCTTCTCCTGCGAGAGCT  
 GATCAAAGAGTTTGGCACAGACCACATCTATGGGGCCGACACTTTCAATGAGATGCAGCCACCT  
 TCCTCAGAGCCCTCCTACCTTGCCGCGAGCCACCACTGCCGTCTATGAGGCCATGACTGCAGTGG  
 AACTGAGGCTGTGTGGCTGCTCCAAGGCTGGCTCTTCCAGCACCAGCCGAGTTCGGGGGCC  
 CGCCAGATCAGGGCTGTGCTGGGAGCTGTGCCCGTGGCCGCTCCTGGTTCTGGACCTGTTT  
 GCTGAGAGCCAGCCTGTGTATAACCCGCACTGCCTCCTTCCAGGGCCAGCCCTTCATCTGGTGCA  
 TGCTGCACAACCTTTGGGGGAAACCATGGTCTTTTTGGAGCCCTAGAGGCTGTGAACGGAGGCC  
 AGAAGCTGCCCGCTCTTCCCCAACTCCACCATGGTAGGCACGGGCATGGCCCCGAGGGCAGC  
 AGCCAGAACGAAGTGGTCTATTCCCTCATGGCTGAGCTGGGCTGGCGAAAGGACCCAGTGCCAG  
 ATTTGGCAGCCTGGGTGACCAGCTTTGCCGCGCGGATGGGGTCTCCACCCGGACGCAGG  
 GGCAGCGTGGAGGCTACTGCTCCGGAGTGTGTACAACGCTCCGGGGAGGCTGCAGGGGCCAC  
 AATCGTAGCCCGCTGGTCAGGCGGCGTCCCTACAGATGAATACCAGCATCTGGTACAACCGAT  
 CTGATGTGTTGAGGCCCTGGCGGCTGCTGCTCACATCTGCTCCCTCCCTGGCCACCAGCCCCG  
 CTTCCGCTACGACCTGCTGGACCTCACTCGGCAGGCAGTGCAGGAGCTGGTCAGCTTGACTAT  
 GAGGAGGCAAGAAGCGCCTACCTGAGCAAGGAGCTGGCCTCCCTGTTGAGGGCTGGAGGCGTCC  
 TGGCCTATGAGCTGCTGCCGGCACTGGACGAGGTGCTGGCTAGTGACAGCCGCTTCTTGCTGGG  
 CAGCTGGCTAGAGCAGGCCCGAGCAGCGGCAGTCAGTGAGGCCGAGGCCGATTTCTACGAGCAG  
 AACAGCCGCTACCAGCTGACCTTGTGGGGCCAGAAGGCAACATCCTGGACTATGCCAACAGC  
 AGCTGGCGGGGTGGTGGCCAACTACTACACCCCTCGCTGGCGGCTTTTCTGGAGGCGCTGGT  
 TGACAGTGTGGCCAGGGCATCCCTTTCCAACAGCACCAGTTTGACAAAATGCTTCCAACCTG  
 GAGCAGGCCTTCGTTCTCAGCAAGCAGAGGTACCCAGCCAGCCGCGAGGAGACACTGTGGACC  
 TGGCCAAGAAGATCTTCTCAAATATTACCCCGCTGGGTGGCCGGCTCTTGG

**B. Secuencia de nucleótidos de IGFII 8-67 R37A (SEQ ID NO: 4)**

CTGTGCGGCGGGGAGCTGGTGGACACCCTCCAGTTCGCTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCA  
 GCAGGCCCGCAAGCCGTGTGAGCGCTCGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGTGTTTCCGCAG  
 CTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA CTGTGCTACCCCGCCAAGTCCGAG

Figura 3

EFGGGGSTR (SEQ ID NO: 22)  
 GAP (SEQ ID NO: 9)  
 GGGGS (SEQ ID NO: 12)  
 GPSGSPG (SEQ ID NO: 23)  
 GPSGSPGT (SEQ ID NO: 24)  
 GPSGSPGH (SEQ ID NO: 25)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPST (SEQ ID NO: 26)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSH (SEQ ID NO: 27)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 28)  
 GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 29)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 30)  
 GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 31)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 32)  
 GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 33)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 34)  
 GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 35)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 36)  
 GAPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 37)  
 GGGGSGGGGSAAAASGGGGSGGGPS (SEQ ID NO: 38)  
 GAPGGGGSGGGGSAAAASGGGGSGGGPSGAP (SEQ ID NO: 39)  
 GGGGSGGGGSAAAASGGGGSGGGGSAAAASGGGGSGGGGSAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 40)  
 GAPGGGGSGGGGSAAAASGGGGSGGGGSAAAASGGGGSGGGGSAAAASGGGPSGAP (SEQ ID NO: 41)  
 GGGGSGGGGSAAAASGGGPSGGGGGSAAAASGGGPSGGGGGSAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 42)  
 GAPGGGGSGGGGSAAAASGGGPSGGGGGSAAAASGGGPSGGGGGSAAAASGGGPSGAP (SEQ ID NO: 43)  
 GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPS (SEQ ID NO: 44)  
 GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGPSGAP (SEQ ID NO: 45)  
 GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPS (SEQ ID NO: 46)  
 GAPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTGPSGAP (SEQ ID NO: 47)  
 GGGSPAPTPAPTAPTPAGGGPS (SEQ ID NO: 48)  
 GAPGGSPAPTPAPTAPTPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 49)  
 GGGSPAPAPTAPAPTAPAGGGPS (SEQ ID NO: 50)  
 GAPGGSPAPAPTAPAPTAPAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 51)  
 GGGSAEAAAKEAAAKEAAA KAGGPS (SEQ ID NO: 52)  
 GAPGGSAEAAAKEAAAKEAAA KAGGPSGAP (SEQ ID NO: 53)  
 GGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAA KAPSGGG (SEQ ID NO: 54)

Figura 3 (continuación)

GAPGGGSPAEEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAPSGGGGAP (SEQ ID NO: 55)  
 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56)  
 GAPGGGSGGGGSGGGGSGAP (SEQ ID NO: 57)  
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 58)  
 GAPGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAP (SEQ ID NO: 59)  
 GGGGA (SEQ ID NO: 60)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPST (SEQ ID NO: 61)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH (SEQ ID NO: 62)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 63)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 64)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 65)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 66)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 67)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 68)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 69)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 70)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 71)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 72)  
 GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPS (SEQ ID NO: 73)  
 GAPGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGPSGAP (SEQ ID NO: 74)  
 GGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 75)  
 GAPGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGGAGGGGAAAAASGGGPSGAP (SEQ ID NO: 76)  
 GGGGAGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPS (SEQ ID NO: 77)  
 GAPGGGAGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPSGGGGAAAAASGGGPSGAP (SEQ ID NO: 78)  
 GGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 79)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 80)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 81)  
 GAPGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGAP (SEQ ID NO: 82)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS [o (GGGA)<sub>8</sub>GGGPS] (SEQ ID NO: 83)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH [o (GGGA)<sub>8</sub>GGPSH] (SEQ ID NO: 84)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPS [o (GGGA)<sub>9</sub>GGGPS] (SEQ ID NO: 85)  
 GGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGPSH [o (GGGA)<sub>9</sub>GGPSH] (SEQ ID NO: 86)

Figura 3 (continuación)

GGGGPAPGPGPAPGPAPGPAGGGPS (SEQ ID NO: 87)  
 GAPGGGGPAPGPGPAPGPAPGPAGGGPGGAP (SEQ ID NO: 88)  
 GGGGPAPAPGPAPAPGPAPAGGGPS (SEQ ID NO: 89)  
 GAPGGGGPAPAPGPAPAPGPAPAGGGPGGAP (SEQ ID NO: 90)  
 (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 12, 56, 58, 91-94)  
 (GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 36, 95-100)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 101-107)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS-GAP (SEQ ID NO: 37, 108-113)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 114-162)  
 GAP-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 163-169)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-AAAAS-GGGPS-(GGGGS)<sub>n</sub>-AAAA-GAP (SEQ ID NO: 170-218)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 219-267)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-PAPAPT-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 268-316)  
 GAP-(GGGGS)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-(AAAKE)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-(GGGGS)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO:  
 544-551)  
 (GGGGA)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 60, 79, 81, 317-320)  
 (GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS (SEQ ID NO: 71, 321-326)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS, (SEQ ID NO: 327-333)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS-GAP (SEQ ID NO: 334-340)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-GGGPS-(GGGGA)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 341-389)  
 GAP-GGGPS-(GGGGA)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 390-396)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-AAAAS-GGGPS-(GGGGA)<sub>n</sub>-AAAA-GAP (SEQ ID NO: 397-445)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 446-494)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-PAPAPT-(Xaa)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO: 495-543)  
 GAP-(GGGGA)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-PAPAP-(Xaa)<sub>n</sub>-(AAAKE)<sub>n</sub>-(Xaa)<sub>n</sub>-(GGGGA)<sub>n</sub>-GAP (SEQ ID NO:  
 552-559)