



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0410520-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0410520-6

(22) Data do Depósito: 24/02/2004

(43) Data da Publicação Nacional: 20/06/2006

(51) Classificação Internacional: C12N 15/82; C12P 21/02; C12N 15/56; A61K 38/47.

(30) Prioridade Unionista: IL 155.588 de 27/04/2003.

(54) Título: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE GLUCOCEREBROSIDASE (GCD) GLICOSILADA EM CULTURA DE PLANTAS

(73) Titular: PROTALIX LTD.. Endereço: 2 Snunit Street - Science Park - Carmiel - 20100, ISRAEL(IL)

(72) Inventor: YOSEPH SHAALTIEL; GIDEON BAUM; SHARON HASHMUELI; AYALA LEWKOWICZ; DANIEL BARTFELD.

(87) Publicação PCT: WO 2004/096978 de 11/11/2004

Código de Controle: 3EB7373A63E4BA1C 37B221D4C6A88370

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 23/02/2021, observadas as condições legais

Expedida em: 23/02/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

"PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE GLUCOCEREBROSIDASE (GCD) GLICOSILADA EM CULTURA DE PLANTAS".

[0001] A presente patente de privilégio de invenção se refere a células hospedeiras transformadas para a produção de proteínas de alta manose e um método e sistema para produção dessas proteínas, especificamente em cultura de plantas.

[0002] A doença de Gaucher é o distúrbio de armazenamento lisossômico mais predominante. É causada por um distúrbio genético recessivo (cromossomo 1 q21 - q31) resultando na deficiência de glicocerebrosidase, também conhecida como glicosilceramidase, que é uma enzima lisossômica ligada por membrana que catalisa a hidrólise da glicocerebrosidase glicosfingolípideo (glicosilceramida, GlcCer) para glicose e ceramida. A doença de Gaucher é causada por mutações de ponto no gene (GBA) de Hgcd (glicocerebrosidase humana), que resulta na acumulação de GlcCer nos lisossomos de macrófagos. As células de armazenamento características, chamadas células de Gaucher, são encontradas no fígado, baço e tutano. Os sintomas clínicos associados incluem hepatosplenomegalia, anemia, trombocitopenia e deterioração do esqueleto.

[0003] O gene que codifica a GCD humana foi sequenciado pela primeira vez em 1985 (6). A proteína consiste de 497 aminoácidos derivados de um propeptídeo 5 3 6-mer. A hGCD madura contém cinco sequências de consenso de aminoácido

de N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr). Quatro desses locais são normalmente glicosilados. A glicosilação do primeiro local é essencial para a produção de proteína ativa. Ambas as cadeiras de alta manose e oligossacarídeo complexo foram identificadas 7. A hGCD de placenta contém 7% carboidrato, 20% dos quais é do tipo alta manose 8. Estudos de mutagênese bioquímica e voltada para o local forneceram um mapa inicial de regiões e resíduos importantes para multiplicação, interação de ativadores e local ativo 9.

[0004] O tratamento de hGCD de placenta com neuraminidase (produzindo uma enzima asialo) resulta em aumento do clearance e taxas de ingestão por células de fígado de ratos com aumento concomitante da atividade enzimática hepática (Furbish et al., 1981, Biochim. Biophys. Acta 673: 425-434). Esse hGC da placenta modificado por glicano é atualmente usado como agente terapêutico no tratamento da doença de Gaucher. Estudos de mutagênese bioquímica e voltada para o local forneceram um mapa inicial de regiões e resíduos importantes para multiplicação, interação de ativadores e local ativo [Grace et al., J. Biol. Chem. 269: 2283-2291 (1994)].

[0005] Há três tipos diferentes de doença de Gaucher, cada uma determinada pelo nível de atividade de hGC. As células principais afetadas pela doença são os macrófagos, que são altamente alargados em função da acumulação de GlcCer, e assim chamadas de "células de Gaucher".

[0006] A identificação de um defeito em GCD como a causa primária da doença de Gaucher levou ao desenvolvimento da terapia de substituição de enzima como estratégia terapêutica para esse distúrbio.

[0007] De Duve sugeriu primeiramente que a substituição da enzima lisossômica faltante com enzima exógena biologicamente ativa pode ser uma abordagem viável para o tratamento de doenças de armazenamento lisossômico [Fed Proc 23 1045 (1964)].

[0008] Desde aquela época, vários estudos sugeriram que a terapia de substituição de enzima pode ser benéfica no tratamento de várias doenças de armazenamento lisossômico. Foi mostrado sucesso maior com indivíduos com doença de Gaucher do tipo I, que foram tratados com enzima exógena (β -glicocerebrosidase), preparada a partir de placenta (Ceredase™) ou, mais recentemente, de forma recombinante (Cerezyme™).

[0009] Glicocerebrosidase não-modificado derivado de fontes naturais é uma glicoproteína com quatro cadeias de carboidratos. Essa proteína não objetiva as células fagócitas no corpo portanto é de valor terapêutico limitado. No desenvolvimento da atual terapia para doença de Gaucher, os açúcares terminais nas cadeias de carboidratos de glicocerebrosidase são removidos sequencialmente pelo tratamento com três glicosidases diferentes. Esse tratamento com glicosidase resulta em uma glicoproteína cujos açúcares terminais consistem de resíduos de manose. Uma vez que os fagócitos têm receptores de manose que reconhecem glicoproteínas e glicopeptídeos com cadeias de oligossacarídeos que terminam em resíduos de manose, a remodelagem de carboidratos de glicocerebrosidase aprimorou a objetivação da enzima para essas células [Furbish et al., Biochim. Biophys. Acta 673: 425, (1981)].

[0010] Conforme aqui indicado, a glicosilação

exerce um papel crucial na atividade de hGCD, portanto a deglicosilação de hGCD expressada em linhas celulares utilizando tunicamicina (células Sf9} ou mutações de ponto abolindo todos os locais de glicosilação (células Sf9 e COS-1), resulta na perda completa da atividade enzimática. Além disso, descobriu-se que o hCGD expresso no *E. coli* era inativo. Mais pesquisas indicaram a significância dos vários locais de glicosilação para atividade de proteína. Em adição ao papel da glicosilação na real atividade de proteína, a enzima produzida comercialmente contém modificações de sequência que facilitam o fornecimento de droga específica. As proteínas glicosiladas são remodeladas após a extração para incluir somente manose contendo sequências de glicano.

[0011] A enzima GCD humana contém 4 locais de glicosilação e 22 lisinas. A enzima produzida de forma recombinante (Cerezyme™) difere da enzima de placenta (Ceredase™) em posição 495 em que uma arginina foi substituída por uma histidina. Mais além, a composição de oligossacarídeos difere entre o recombinante e a GCD de placenta retém uma cadeia de alta manose. Conforme acima mencionado, ambos os tipos de GCDs são tratados com três diferentes glicosidases (neuraminidase, galactosidase e P-N acetil glicosaminidase) para expor manoses terminais, que possibilitam objetivar células fagócitas. Uma preparação farmacêutica composta da enzima produzida de forma recombinante é descrita na patente americana nº 5.549.892. Deve ser notado que todas as referências mencionadas são aqui incorporadas por meio de referência em sua totalidade.

[0012] Um prejuízo associado à terapia de substituição de enzima lisossômica existente é que a

bioatividade *in vivo* da enzima é indesejavelmente baixa, talvez por causa da baixa ingestão, objetivação reduzida a lisossomos das células específicas em que o substrato é acumulado e uma meia-vida funcional curta nas lisossomos.

[0013] Outra desvantagem importante das enzimas GCD· recombinantes é o seu custo, que pode causar um enorme prejuízo econômico nos sistemas de saúde. O alto custo dessas enzimas recombinantes resulta de um complexo protocolo de purificação, e as quantidades relativamente grandes de terapêutica necessária para os tratamentos existentes. Há, portanto, uma necessidade urgente de se reduzir o custo de GCD para que essa terapia salva-vidas possa ser fornecida a todos que dela necessitem, de forma mais acessível.

[0014] As proteínas para uso farmacêutico são tradicionalmente produzidas em sistemas de expressão mamíferos ou bacterianos. Na década passada, um novo sistema de expressão foi desenvolvido nas plantas. Essa metodologia utiliza *Agrobacterium*, uma bactéria capaz de inserir moléculas únicas de DNA presas (T-DNA) no genoma da planta. Em função da relativamente simplicidade de introdução de genes para produção em massa de proteínas e peptídeos, essa metodologia está se tornando cada vez mais popular como um sistema alternativo de expressão de proteína 1.

[0015] Enquanto as modificações pós-translacionais não existem em sistemas de expressão bacterianas, os sistemas de expressão derivados de planta facilitam essas modificações conhecidas por serem cruciais para a expressão e atividades proteínas. Uma das principais diferenças entre o sistema de expressão de proteínas mamífero e o de plantas é a variação das cadeias laterais de açúcar de

proteína, causada pelas diferenças nas trilhas biossintéticas. A glicosilação foi mostrada como tendo um profundo efeito sobre a atividade, multiplicação, estabilidade, suscetibilidade a proteases, taxa de *clearance* do sangue e potencial antigênico de proteínas. Então, qualquer produção de proteína nas plantas deve levar em consideração as potenciais ramificações da glicosilação da planta.

[0016] A glicosilação da planta é dividida em duas categorias: modificações de ligação N e ligação O (2). Esses dois tipos diferem no aminoácido ao qual a porção de glicano é ligada a N são ligados aos resíduos de Asn, enquanto a ligação O é a ligação a resíduos de Ser ou Thr. Além disso, as sequências de glicano de cada tipo possuem características exclusivas. Dos dois tipos, a glicosilação ligada a N é mais abundante, e seu efeito sobre a função de proteína foi extensivamente estudado. Glicanos ligados a O, por outro lado, são relativamente escassos e há menos informações sobre seus efeitos sobre as proteínas.

[0017] A técnica anterior não ensina ou sugere um dispositivo, sistema ou método para produção seletiva de proteínas glicosiladas na cultura de plantas. A técnica anterior também não ensina ou sugere um dispositivo, sistema ou método para produção de proteínas de alta manose na cultura de plantas. A técnica anterior também não ensina ou sugere um dispositivo, sistema ou método para produção de proteínas na cultura de planta por meio do retículo endoplasmático (RE). A técnica anterior também não ensina ou sugere um dispositivo, sistema ou método para produção de proteínas em cultura de plantas por meio do retículo endoplasmático (RE) enquanto passa pelo corpo Golgi. A técnica anterior também não ensina

ou sugere um dispositivo, sistema ou método para produção de proteínas em cultura de plantas pelo uso de um sinal de RE para passar pelo corpo Golgi.

[0018] A presente invenção supera essas desvantagens da técnica anterior fornecendo um dispositivo, sistema ou método para produção de proteínas glicosiladas na cultura de plantas, em específico, proteínas com uma glicosilação de alta manose, ao mesmo tempo em que opcional e preferivelmente objetiva (e/ou de outra forma manipula o processamento de) tais proteínas com um sinal de RE. Sem desejar ser limitado a uma única hipótese, acredita-se que essa objetivação faz as proteínas passarem pelo corpo Golgi e com isso retém a desejada glicosilação, em específico a glicosilação de alta manose. Deve ser notado que o termo "cultura de plantas", conforme aqui utilizado, inclui qualquer tipo de célula de planta transgênica e/ou de outra forma transformada geneticamente que é cultivada na cultura. A engenharia genética pode ser opcionalmente permanente ou transitória. Preferivelmente, as células de características de cultura que não são montadas para formar uma planta completa, de modo que no mínimo uma estrutura biológica de uma planta não está presente. Opcional e preferivelmente, a cultura pode ter uma pluralidade de tipos diferentes de células de plantas, mas preferivelmente a cultura possui um tipo específico de célula de plantas. Deve ser observado que opcionalmente as culturas de plantas com um tipo específico de células de plantas podem ser originalmente derivadas de uma pluralidade de tipos diferentes dessas células de plantas.

[0019] As células de plantas podem ser cultivadas de acordo com qualquer tipo de método de subcultivo

adequado, incluindo sem limitações à cultura em uma superfície sólida (como um recipiente ou placa de plástico para cultura, por exemplo) ou em suspensão.

[0020] A invenção se refere também a vetores e métodos de expressão e produção de enzimas lisossômicas de alta manose e enzimaticamente ativas usando raiz de plantas transgênicas, em específico, células de cenoura. Mais especificamente, a invenção se refere a células hospedeiras, em específico células de cenouras suspensas transgênicas, vetores e métodos para expressão de alta produção e produção de Glicocerebrosidase de alta manose biologicamente ativa (GCD). A invenção fornece ainda composições e métodos para tratamento de doenças de armazenamento lisossômico.

[0021] A presente invenção é também composta de um dispositivo, sistema e método para fornecer quantidade suficiente de enzimas lisossômicas biologicamente ativas e, especificamente, GCD humana, a células deficientes. A presente invenção é também de células hospedeiras compreendendo composições novas de vetores que permitem a produção eficiente de genes que codificam as enzimas lisossômicas, como GCD.

[0022] A presente invenção portanto resolve a antiga necessidade de uma tecnologia economicamente viável para produção de proteínas com exigências de glicosilação específicas, como a glicosilação de alta manose de enzimas lisossômicas como GCD, por exemplo. A presente invenção pode resolver essa necessidade antiga utilizando cultura de células de plantas.

[0023] A fim de explicar melhor a presente invenção, uma breve explicação da trilha biossintética de

proteínas de alta manose é agora fornecida. A trilha biossintética básica de glicanos de alta manose e com ligações N complexas é altamente conservada entre todos os eucariotes. A biossíntese começa no Retículo Endoplasmático (RE) com a transferência do precursor de glicano de um veículo lipídico dolicol a um resíduo de Asn específico sobre a proteína pela transferase de oligossacaril. O precursor é subsequentemente modificado no RE pelas glicosidases I e II e uma manosidase hipotética para produzir estruturas de alta manose, similares ao processo que ocorre em mamíferos.

[0024] As modificações posteriores da sequência de glicano às estruturas híbridas ocorrem no Golgi. Tais modificações incluem a remoção de um dos quatro resíduos de manose por α -manosidase I, adição de um resíduo de N-acetilglicosamina, remoção dos dois resíduos de manose adicionais por α -manosidase II, adição de N-acetilglicosamina e opcionalmente, nesse estágio, resíduos de xilose e fucose podem ser adicionados para produzir glicanos ligados a N específicos de plantas. Após a transferência de xilose e fucose ao núcleo, glicanos N do tipo complexo podem ser ainda processados por meio da adição de fucose e galactose terminal. Outras modificações podem ocorrer durante o transporte de glicoproteínas.

[0025] Várias abordagens são atualmente usadas na técnica anterior para controlar e ajustar a glicosilação de proteínas nas plantas, todas têm deficiências significantes, especificamente em comparação com a presente invenção. Modificações grandes, como a inibição completa de glicosilação ou a remoção de locais de glicosilação da cadeia de peptídeos é uma estratégia. Entretanto, essa abordagem pode

resultar em defeitos estruturais. Uma abordagem adicional envolve combate e introdução de enzimas de processamento de carboidratos específicas. Novamente, essa abordagem é difícil e também pode ter efeitos prejudiciais sobre as próprias células de plantas.

[0026] A presente invenção supera essas deficiências de abordagem da técnica anterior com o uso de um sinal de RE e/ou pelo bloqueio de secreção de RE para o corpo de Golgi. Sem desejar se limitar a uma única hipótese, uma vez que a estrutura de alta manose de enzimas lisossômicas é preferida, se a secreção puder ser bloqueada e a proteína puder ser mantida no RE, as estruturas de alta manose são obtidas sem necessidade de remodelagem.

[0027] Conforme acima indicado, as proteínas transportadas por meio do sistema de endomembrana passam primeiramente pelo retículo endoplasmático. O sinal de transporte necessário para essa etapa é representado por uma sequência de sinal no fim do terminal N da molécula, o chamado peptídeo de sinal. Assim que esse peptídeo de sinal alcança sua função, que é inserir a proteína precursora ligada a ele no retículo endoplasmático, é separado de forma proteolítica da proteína precursora. Em virtude de sua função específica, esse tipo de sequência de peptídeo de sinal foi conservado a um alto grau durante a evolução em todas as células vivas, independentemente de serem bactérias, leveduras, fungos, animais ou plantas.

[0028] Muitas proteínas de plantas, que são inseridas no retículo endoplasmático em virtude do peptídeo de sinal não residir no RE, mas são transportadas do retículo endoplasmático ao Golgi e continuam trafegando do Golgi para

os vacúolos. Uma classe desses sinais de sorteio desses resíduos de tráfego são sinais que residem na terminal e da proteína precursora [Neuhaus e Rogers I (1998) Plant Mol. Biol. 38: 127-144] Espera-se que as proteínas contendo peptídeo de sinal de terminal N para inserção no retículo endoplasmático e um sinal de objetivação vacuolar de terminal C contenham glicanos complexos, que são ligados a elas no Golgi [Lerouge et al., (1998) Plant Mol. Biol. 38: 31-48]. A natureza de tais sinais de sorteio de terminal C pode variar de forma muito ampla. A patente americana ng 6.054.637 descreve fragmentos de peptídeos obtidos da região de quitinase básica de tabaco, que é uma proteína vacuolar que age como peptídeos de objetivação vacuolar. Um exemplo de proteína vacuolar contendo um sinal de objetivação de terminal C e glicanos complexos é a proteína de armazenamento de faseolina de sementes de feijão (Frigerio et al., (1998) Plant Cell 10: 1031-1042; Frigerio et al., (2001) Plant Cell 13: 1109-1126].

[0029] O paradigma é que em todas as células eucarióticas as proteínas vacuolares passam pelo RE e o Golgi antes de se separar no vacúolo como seu destino final. Surpreendentemente, as células de raízes de plantas transformadas da presente invenção produziram uma inesperada GCD de alta manose. Vantajosamente, descobriu-se que esse produto de alta manose é biologicamente ativo e, portanto, não foram necessárias mais etapas para sua ativação. Sem desejar se limitar a uma única hipótese, aparentemente o uso de um sinal de RE com a proteína recombinante produzida na cultura de célula de plantas pôde superar o transporte ao Golgi, e então reter a desejada glicosilação de alta manose.

Opcionalmente, qualquer tipo de mecanismo que é capaz de produzir glicosilação de alta manose, incluindo qualquer tipo de mecanismo para passar pelo Golgi, pode ser usado de acordo com a presente invenção.

[0030] Em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a uma célula hospedeira que produz uma proteína recombinante de alta manose de interesse. Essa célula pode ser transformada ou transfectada com uma molécula de ácido nucléico recombinante codificando uma proteína de interesse ou com um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucléico. Essa molécula de ácido nucléico é composta de uma primeira sequência de ácido nucléico codificando a proteína de interesse ligada de forma operável a uma segunda sequência de ácido nucléico codificando um vacuolar objetivando um peptídeo de sinal. A primeira sequência de ácido nucléico pode ser ainda opcionalmente ligada de forma operável a uma terceira sequência de ácido nucléico codificando um RE (retículo endoplasmático) objetivando um peptídeo de sinal. A célula hospedeira da invenção é caracterizada pelo fato de que a proteína se é produzida pela célula de forma altamente manosilada.

[0031] A célula hospedeira da invenção pode ser uma célula eucariótica ou procariótica.

[0032] Em uma configuração, a célula hospedeira da invenção é uma célula procariótica, preferivelmente uma célula bacteriana, mais preferivelmente, uma célula *Agrobacterium tumefaciens*. Essas células são usadas para infectar as células hospedeiras de plantas preferidas abaixo descritas.

[0033] Em outra configuração preferida, a

célula hospedeira da invenção pode ser uma célula eucariótica, mais preferivelmente, uma célula de plantas, e mais preferivelmente uma célula de raiz selecionada do grupo que consiste de célula de salsão, célula de gengibre, célula de rabanetes e célula de cenouras transformada de *Agrobacterium rhizogenes*.

[0034] Em uma configuração preferida, a célula de raiz é uma célula de cenouras. Deve ser nota do que as células de cenoura transformadas da invenção são cultivadas em suspensão. Conforme acima mencionado e descrito nos Exemplos, essas células forma transformadas com as células de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0035] Em outra configuração, a molécula de ácido nucléico recombinante compreendida na célula hospedeira da invenção é composta de uma sequência de ácido nucléico codificando uma enzima lisossômica que está em ligação operável com uma segunda sequência de ácido nucléico codificando um vacuolar objetivando um peptídeo de sinal derivado do gene A de quitinase de tabaco. Esse peptídeo de sinal vacuolar tem a sequência de amino ácidos conforme denotada pela SEQ ID NQ: 2. A primeira sequência de ácido nucléico pode ser ainda opcionalmente ligada de forma operável com uma terceira sequência de ácido nucléico codificando um RE (retículo endoplasmático) objetivando um peptídeo de sinal conforme denotado pela SEQ ID N° 1. Em uma configuração, a molécula recombinante de ácido nucléico compreendida na célula hospedeira da invenção é composta ainda de um promotor que é funcional em células de plantas. Esse promotor deve ser ligado de forma operável à molécula recombinante da invenção.

[0036] Em outra configuração, essa molécula

recombinante de ácido nucléico pode ainda opcionalmente ser composta de um finalizador ligado de forma operável que seja preferivelmente funcional nas células de plantas. A molécula recombinante de ácido nucléico da invenção pode ainda opcionalmente ser composta de controle adicional, elementos promotores e reguladores e/ou marcadores selecionáveis. Deve ser observado que esses elementos reguladores são ligados de forma operável à molécula recombinante.

[0037] Em uma configuração preferida, a proteína de alta manose de interesse produzida pela célula hospedeira da invenção pode ser uma glicoproteína de alta manose com resíduos terminais de manose expostos.

[0038] Essa proteína de alta manose pode estar de acordo com outra configuração preferida, uma enzima lisossômica selecionada do grupo que consiste de glicocerebrosidase (GCD), esfingomielinase ácido, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase e sialidase. Em uma configuração preferida, a enzima lisossômica pode ser a glicocerebrosidase (GCD) humana. Doravante, GCD recombinante, rGCD, rhGCD, todos se referem às várias formas de GCD humana recombinante, a menos que de outra forma indicado.

[0039] Conforme descrito anteriormente, a doença de Gaucher, o mais prevalente distúrbio de armazenamento lisossômico, é causada por mutações de ponto no gene (GBA) de hGCD (glicocerebrosidase humana), o que resulta em acumulação de GlcCer nas lisossomos de macrófagos. A identificação de deficiência de GCD como a causa primária da doença de Gaucher levou ao desenvolvimento da terapia de

substituição de enzima como estratégia terapêutica para esse distúrbio. Entretanto, a glicosilação exerce um papel crucial na atividade de hGCD e ingestão a células alvo.

[0040] Portanto, de acordo com outras configurações preferidas da presente invenção, a hGCD adequadamente glicosilada é preferivelmente fornecido pelo controle da expressão de hGCD na cultura de células de plantas, opcional e mais preferivelmente fornecendo um sinal de RE e/ou de outra forma opcional e mais preferivelmente bloqueando o transporte ao Golgi.

[0041] Opcional e preferivelmente, o hGCD tem no mínimo uma cadeia de oligossacarídeo composto de um resíduo de manose exposto para o tratamento ou prevenção de doença de Gaucher.

[0042] Mais ainda, em uma configuração específica, essa célula hospedeira preferida é transformada ou transfectada por urna molécula recombinante de ácido nucléico que é composta ainda de um promotor ³⁵S de Vírus de Mosaico da Couve-Flor, um finalizador de síntese de octopina de Agrobacterium tumefaciens, e o elemento regulador seja o elemento aprimorador translacional ômega de TMV (Vírus de Mosaico de tabaco). De acordo com uma configuração preferida, essa molécula recombinante de ácido nucléico é composta da sequência de ácido nucléico substancialmente conforme denotado por SEQ ID N2: 13 e codifica um GCD de alta manose com a sequência de aminoácidos substancialmente conforme denotado pela SEQ ID N 2: 14.

[0043] Deve ser apreciado que a presente invenção fornece ainda um vetor de expressão composto de uma molécula de ácido nucléico codificando uma enzima lisossômica

biologicamente ativa.

[0044] Em uma configuração preferida, o vetor de expressão da invenção é composto de uma molécula de ácido nucléico codificando uma glicocerebrosidase (GCD) humana de alta manose biologicamente ativa. Preferivelmente, esse vetor de expressão preferido é composto de uma molécula recombinante de ácido nucléico que tem a sequência de ácido nucléico conforme denotado por SEQ ID N° 13.

[0045] Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere a uma proteína de alta manose recombinante produzida pela célula hospedeira da invenção.

[0046] Em uma configuração preferida, essa proteína de alta manose pode ser uma enzima lisossômica de alta manose biologicamente ativa selecionada do grupo que consiste de glicocerebrosidase (GCD), esfingomielinase ácido, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronatosulfatase, α -manosidase e sialidase. Mais preferivelmente, essa enzima lisossômica pode ser glicocerebrosidase (GCD) humana.

[0047] Mais além, a invenção fornece uma enzima recombinante lisossômica de alta manose e biologicamente ativa com no mínimo uma cadeia de oligossacarídeos composta de um resíduo de manose exposto.

[0048] De acordo com uma configuração a enzima recombinante lisossômica da invenção pode se aglutinar a um receptor de manose em uma célula alvo em um local alvo. Preferivelmente, esse local pode estar dentro de um paciente sofrendo de doença de armazenamento lisossômico.

[0049] Deve ser observado que a enzima

recombinante lisossômica tem aumento de afinidade na célula alvo, em comparação com a afinidade correspondente de uma enzima lisossômica que ocorre naturalmente na célula alvo. Em uma configuração específica, a célula alvo no local alvo pode ser uma célula Kupffer no fígado do paciente.

[0050] Em uma configuração preferida, a enzima recombinante lisossômica pode ser selecionada do grupo que consiste de glicocerebrosidase (GCD), esfingornielinase ácido, hexosaminidase, α -Nacetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronatosulfatase, α -manosidase e sialidase.

[0051] Mais preferivelmente, essa enzima recombinante lisossômica é glicocerebrosidase (GCD).

[0052] Em um terceiro aspecto, a invenção se refere a um método de produção de uma proteína de alta manose. Coerentemente, o método da invenção é composto das etapas de: (a) preparação de uma cultura para células hospedeiras recombinantes transformadas ou transfectadas com um polinucleotídeo recombinante codificando uma proteína recombinante de interesse ou com um vetor de expressão composto das moléculas recombinantes de ácido nucléico; (b) cultivo da cultura de células hospedeiras sob condições que permitem a expressão da proteína, caracterizado pelo fato de que as células hospedeiras produzam a proteína de forma altamente manosilada; (c) recuperação da proteína das células e colheita das células da cultura fornecidas em (a); e (d) purificação da proteína da etapa (c) por um método de purificação de proteína adequado.

[0053] De acordo com uma configuração preferida, a célula hospedeira usada por esse método é a

célula hospedeira da invenção.

[0054] Em outra configuração preferida, a proteína de alta manose produzida pelo método da invenção pode ser uma enzima lisossômica de alta manose biologicamente ativa com no mínimo uma cadeia de oligossacarídeos composta de resíduo de manose exposto.

[0055] Essa enzima recombinante pode se aglutinar a um receptor de manose em uma célula alvo em um local alvo. Mais especificamente, a enzima recombinante produzida pelo método da invenção tem afinidade aumentada na célula alvo, em comparação com a afinidade correspondente de uma enzima lisossômica que ocorre naturalmente com a célula alvo. Coerentemente, a célula alvo no local alvo pode ser uma célula Kupffer no fígado do paciente.

[0056] Em uma configuração específica, essa enzima lisossômica pode ser selecionada do grupo que consiste de glicocerebrosidase (GCD), esfingomielinase ácido, hexosaminidase, α -Nacetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronatosulfatase, α -manosidase e sialidase. Mais preferivelmente, essa enzima lisossômica pode ser glicocerebrosidase (GCD).

[0057] Em outra configuração preferida, a célula hospedeira usada pelo método da invenção pode ser uma célula de raiz selecionada do grupo que consiste de célula de salsa, célula de gengibre, célula de rabanetes e célula de cenouras transformada de *Agrobacterium rhizogenes*. Mais preferivelmente, a célula de raiz é uma célula de cenouras. Deve ser notado especificamente que no método da invenção, as células de cenoura transformadas da invenção são cultivadas

em suspensão.

[0058] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere a um método para tratamento de um paciente com doença de armazenamento lisossômico utilizando enzima recombinante lisossômica exógena, composto de: (a) fornecimento de uma forma recombinante biologicamente ativa de enzima lisossômica purificada de células transformadas de raiz de plantas, e capaz de apontar eficientemente as células deficientes na enzima lisossômica. Essa enzima recombinante biologicamente ativa tem resíduos de manose terminal exibicionismo nos oligossacarídeos anexados; e (b) administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da enzima lisossômica recombinante biologicamente ativa ao paciente. Em uma configuração preferida, a enzima recombinante lisossômica de alta manose usada pelo método da invenção pode ser produzida pela célula hospedeira da invenção. Preferivelmente, essa célula hospedeira é uma célula de cenoura.

[0059] Em ainda outra configuração preferida, a enzima lisossômica usada pelo método da invenção pode ser uma enzima lisossômica de alta manose seja composta de no mínimo uma cadeia de oligossacarídeos compreendendo um resíduo de manose exposto. Essa enzima recombinante pode se aglutinar a um receptor de manose em uma célula alvo em um local alvo dentro de um paciente. Mais preferivelmente, essa enzima lisossômica recombinante tenha afinidade aumentada na célula alvo em comparação com a correspondente afinidade de uma enzima lisossômica que ocorre naturalmente da célula alvo.

[0060] Mais especificamente, a enzima lisossômica usada pelo método da invenção pode ser selecionada

do grupo que consiste de glicocerebrosidase (GCD), esfingomielinase ácido, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase e sialidase. Preferivelmente, essa enzima lisossômica seja glicocerebrosidase (GCD).

[0061] De acordo com uma configuração preferida, o método da invenção é portanto, voltado para o tratamento de uma doença de armazenamento lisossômico, em especial a doença de Gaucher.

[0062] Nesse caso, a célula alvo no local alvo pode ser uma célula Kupffer no fígado do paciente.

[0063] A invenção fornece ainda uma composição farmacêutica para o tratamento de uma doença lisossômica de armazenamento compreendendo como um ingrediente ativo uma enzima recombinante lisossômica biologicamente ativa de alta manose conforme definido pela invenção. A composição da invenção pode opcionalmente compreender ainda um diluente, veiculou ou excipiente aceitável.

[0064] Em uma configuração específica, a composição da invenção é voltada para o tratamento de doença de Gaucher. Tal composição pode ser preferivelmente composta como ingrediente eficaz de uma glicocerebrosidase (GCD) humana de alta manose biologicamente ativa, conforme definido pela invenção.

[0065] A invenção se refere ao uso de urna enzima recombinante de alta manose biologicamente ativa da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença de armazenamento lisossômico. Mais preferivelmente, tal doença pode ser uma doença de Gaucher.

[0066] Coerentemente, essa enzima lisossômica biologicamente ativa é uma glicocerebrosidase (GCD) humana de alta manose biologicamente ativa, conforme definido pela invenção.

[0067] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma célula hospedeira produzindo uma proteína recombinante de alta manose, composta de um polinucleotídeo codificando a proteína recombinante e um sinal para fazer com que a proteína recombinante e um sinal para fazer a proteína recombinante seja produzida como uma proteína de alta manose. Preferivelmente, o polinucleotídeo é composto de uma primeira sequência de ácido nucléico codificando um peptídeo de sinal. Opcionalmente, o peptídeo de sinal é composto de um RE (retículo endoplasmático) objetivando o peptídeo de sinal. Preferivelmente, o polinucleotídeo é composto ainda de uma terceira sequência de ácido nucléico que codifique um vacuolar objetivando o peptídeo de sinal.

[0068] Preferivelmente, o sinal faz com que a proteína recombinante seja apontada para o RE. Mais preferivelmente, o sinal é composto de um peptídeo de sinal para fazer com que a proteína recombinante seja apontada para o RE. Mais preferivelmente, o polinucleotídeo é composto de um segmento de ácido nucléico para codificar o peptídeo de sinal.

[0069] Opcional e preferivelmente, o sinal faz com que a proteína recombinante passe pelo Golgi. Preferivelmente, o sinal é composto de um peptídeo de sinal para fazer com que a proteína recombinante não seja apontada para o Golgi. Mais preferivelmente, o polinucleotídeo é composto de um segmento de ácido nucléico para codificar o

peptídeo de sinal.

[0070] Opcional e preferivelmente, a célula hospedeira é uma célula eucariótica ou uma célula procariótica. Opcionalmente, a célula procariótica é uma célula bacteriana, preferivelmente uma célula *Agrobacterium tumefaciens*. Preferivelmente, célula eucariótica é a célula de uma planta. Mais preferivelmente, a célula de planta é uma célula de raiz selecionada do grupo que consiste de célula de salsa, célula de gengibre, célula de rabanetes e célula de cenouras transformada de *Agrobacterium rhizogenes*. Mais preferivelmente, a célula de raiz é uma célula de cenouras.

[0071] Preferivelmente, o polinucleotídeo recombinante é composto de uma primeira sequência de ácido nucléico que codifica a proteína de interesse que está em ligação operável com uma segunda sequência de ácido nucléico que codifica um vacuolar objetivando um peptídeo de sinal derivado do gene A básico de quitinase de tabaco, que o peptídeo de sinal vacuolar tenha a sequência de aminoácido conforme denotado pela SEQ ID N^a: 2, caracterizada pelo fato de que a primeira sequência de ácido nucléico seja opcionalmente ligada também de forma operável a uma terceira sequência de ácido nucléico codificando um RE (retículo endoplasmático) objetivando o peptídeo de sinal conforme denotado pela SEQ ID N^o: 1.

[0072] Mais preferivelmente, o polinucleotídeo recombinante é composto de um promotor que seja funcional em células de planta, caracterizada pelo fato de que o promotor seja ligado de forma operável à molécula recombinante.

[0073] Mais preferivelmente, o

polinucleotídeo recombinante é composto ainda de um finalizador que seja funcional em células de planta, caracterizado pelo fato de que o finalizador seja ligado de forma operável à molécula recombinante.

[0074] Também mais preferivelmente, o polinucleotídeo recombinante é composto ainda de um controle adicional, elementos promotores e regulamentares e/ou marcadores selecionáveis, caracterizada pelo fato de que os elementos regulamentares sejam ligados de forma operável à molécula recombinante.

[0075] Preferivelmente, a proteína de alta manose é uma glicoproteína de alta manose com glicosilação com no mínimo um resíduo de manose exposto. Mais preferivelmente, a proteína de alta manose é uma enzima lisossômica ativa de alta manose selecionada do grupo que consiste de glicocerebrosidase (GCD), esfingomielinase ácido, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase e sialidase.

[0076] Mais preferivelmente, a enzima lisossômica é glicocerebrosidase (GCD) humana.

[0077] Preferivelmente, a GCD é composta da sequência de aminoácido substancialmente conforme denotado pela SEQ ID N°:8, codificada pela

[0078] sequência de ácido nucléico conforme denotado pela SEQ ID N° : 7 .

[0079] Mais preferivelmente, a célula é transformada ou transfectada com um polinucleotídeo recombinante ou com um vetor de expressão composto da molécula, que o polinucleotídeo recombinante seja composto

ainda de um promotor ³⁵S do Vírus do Mosaico de Couve-flor, um finalizador de síntese de octopina de *Agrobacterium tumefaciens*, e o elemento regulador seja o elemento aprimorador translacional omega de TMV (Vírus de Mosaico de tabaco) e com a sequência de ácido nucléico substancialmente conforme denotado pela SEQ ID N² : 13, codificando GCD com a sequência de ácido nucléico substancialmente conforme denotado pela SEQ ID N²: 14.

[0080] De acordo com as configurações preferidas, é fornecida uma proteína recombinante de alta manose produzida pela célula hospedeira acima descrita.

[0081] Preferivelmente, a proteína de alta manose é uma enzima lisossomal de alta manose biologicamente ativa selecionada a partir de um grupo compreendendo glucocerebrosidase (GCD), ácido esfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, ácido lipase, α -galactosídeo, glucocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase e sialidase.

[0082] Mais preferivelmente, a enzima lisossômica é glucocerebrosidase (GCD) humano.

[0083] De acordo com outras Configurações preferidas da presente invenção, há determinada uma proteína recombinante de alta manose biologicamente ativa tendo ao menos uma cadeia de oligossacarídeo compreendendo um resíduo exposto de manose.

[0084] De acordo com ainda outras configurações preferidas, há determinada uma proteína recombinante compreendendo uma primeira porção tendo uma atividade de peptídeo sinal, e uma segunda porção tendo atividade de enzima lisossomal, a primeira porção fazendo com

que a segunda porção seja processada em uma célula vegetal com ao menos uma cadeia de oligossacarídeo compreendendo um resíduo exposto de manose.

[0085] Preferencialmente, a enzima lisossomal compreende uma proteína para o tratamento ou prevenção da doença de Gaucher.

[0086] Mais preferivelmente, a proteína compreende hGCD.

[0087] Preferencialmente, a primeira porção compreende um peptídeo sinal tendo como alvo uma célula vegetal RE. Mais preferivelmente, a enzima recombinante pode ligar-se ao receptor manose em uma célula alvo em um local alvo dentro de um indivíduo sofrendo de uma doença de depósito lisossômica. O mais preferível, a enzima lisossômica recombinante aumentou a semelhança para a célula alvo em comparação com a semelhança correspondente da enzima lisossômica de ocorrência natural com a célula alvo.

[0088] Também o mais preferível, a enzima lisossômica recombinante é selecionada a partir do grupo compreendendo glucocerebrosidase (GCD), ácido esfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, ácido lipase, α -galactosídeo, glucocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase ou sialidase.

[0089] Preferencialmente, a enzima lisossômica recombinante é glucocerebrosidase (GCD).

[0090] Também preferivelmente, a célula alvo. no local alvo é uma célula Kupffer no fígado do indivíduo.

[0091] De acordo com outras configurações preferidas, há determinada uma proteína recombinante de alta

manose, produzida em cultura celular vegetal. Preferencialmente, a proteína apresenta um peptídeo de sinal vegetal objetivando uma proteína ao RE.

[0092] Mais preferencialmente, o peptídeo sinal vegetal compreende um peptídeo tendo como alvo a proteína ao RE em uma cultura celular vegetal da raiz. E o mais preferível é que a cultura celular vegetal da raiz compreenda células de cenoura.

[0093] De acordo ainda com outras configurações preferidas, há determinada uma proteína hGCD recombinante de alta manose, produzida em cultura celular vegetal.

[0094] De acordo com outras configurações preferidas, há determinado o uso de uma cultura celular vegetal para a produção de uma proteína de alta manose.

[0095] De acordo com outras configurações preferidas, há determinado um método de produção de proteína de alta manose compreendendo: preparação de uma cultura de células hospedeiras recombinantes transformadas ou transfectadas com um codificador polinucleotídeo recombinante para uma proteína recombinante; cultivo a cultura de célula hospedeira sob condições que permitem a expressão da proteína, onde as células hospedeiras produzem a proteína de uma forma altamente manosilada.

[0096] Preferencialmente, a cultura de célula hospedeira é cultivada em suspensão. Mais preferivelmente, o método ainda compreende a purificação da proteína.

[0097] De acordo com outras configurações preferidas, o método é realizado com a célula hospedeira conforme descrito anteriormente. Preferencialmente, a

proteína de alta manose é uma enzima lisossomal de alta manose ativa tendo ao menos uma cadeia de oligossacarídeo compreendendo um resíduo exposto de manose. Mais preferivelmente, a enzima recombinante liga-se com um receptor de manose em uma célula alvo em um local alvo. O mais preferível é que a enzima recombinante tenha aumentado a semelhança com a célula alvo em comparação com a semelhança correspondente de uma enzima lisossomal de ocorrência natural com a célula alvo.

[0098] Preferencialmente, a enzima lisossomal é selecionada a partir do grupo que consiste em glucocerebrosidase (GCD), ácido esfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, ácido lípase, α -galactosídeo, glucocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase e sialidase.

[0099] Mais preferivelmente, a enzima lisossômica é glucocerebrosidase (GCD). O mais preferível, a célula alvo no local alvo é a célula Kupffer no fígado do indivíduo.

[00100] Preferencialmente, a célula hospedeira é uma célula vegetal de raiz de um grupo compreendendo a célula raiz transformada *Agrobacterium rhizogenes*, célula do aipo, célula do gengibre, célula do rábano silvestre e da célula da cenoura.

[00101] Mais preferivelmente, a célula de raiz vegetal é a célula da cenoura.

[00102] Mais preferivelmente, as células hospedeiras transformadas da cenoura são cultivadas em suspensão.

[00103] De acordo ainda com outras

configurações preferidas, há determinado um método para tratar um indivíduo tendo uma doença de depósito lisossômica, usando enzima lisossomal recombinante exógena, compreendendo: fornecer uma forma de enzima recombinante biologicamente ativa de enzima lisossomal purificada a partir das células vegetais da raiz e capazes de ter eficientemente como alvo células anormais deficientes na enzima lisossomal, onde a enzima recombinante biologicamente ativa expõe resíduos terminais de manose em oligossacarídeos anexos e administrou uma quantidade terapeuticamente efetiva da enzima lisossômica recombinante biologicamente ativa no indivíduo. Este método pode, de maneira opcional, ser realizado com qualquer célula hospedeira e/ou proteína conforme anteriormente descrito.

[00104] Preferencialmente, a enzima recombinante pode ligar-se ao receptor manose em uma célula alvo em um local alvo dentro de indivíduo. Mais preferivelmente, a enzima lisossômica recombinante aumentou a semelhança com a célula alvo, em comparação com a semelhança correspondente da enzima lisossomal de ocorrência natural com a célula alvo. O mais preferível, a enzima lisossomal é selecionada a partir de um grupo compreendendo glucocerebrosidase (GCD), ácido esfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, ácido lipase, α -galactosídeo, glucocerebrosidase, α -L-iduronidase, iduronato sulfatase, α -manosidase ou sialidase. Também o mais preferível, a enzima lisossomal é glucocerebrosidase (GCD).

[00105] Também mais preferivelmente, a doença de depósito lisossomal é a doença de Gaucher. Assim mais preferivelmente, a célula alvo no local alvo é a célula Kupffer no fígado do indivíduo.

[00106] De acordo com outras configurações preferidas, há determinada uma composição farmacêutica para o tratamento de uma doença de depósito lisossomal tendo como ingrediente ativo uma enzima lisossomal de alta manose biologicamente ativa conforme descrito acima, cuja composição ainda compreende, opcionalmente, diluente, transportador ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis. Preferencialmente, a doença de depósito lisossomal é a doença de Gaucher. Mais preferivelmente, a enzima lisossomal recombinante é um glucocerebrosidase (GCD) humano de alta manose biologicamente ativo.

[00107] De acordo ainda com outras configurações preferidas, há determinado o uso de uma enzima lisossomal recombinante de alta manose biologicamente ativa, conforme descrito acima, na manufatura de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença de depósito lisossomal. Preferencialmente, a doença é a doença de Gaucher. Mais preferivelmente, a enzima lisossomal biologicamente ativa é um glucocerebrosidase (GCD) humano de alta manose biologicamente ativo.

[00108] A invenção será ainda mais descrita nas figuras seguintes que são ilustrativas somente e não limitam o escopo da invenção que também é definido pelas reivindicações anexas.

[00109] A invenção é aqui descrita como um exemplo somente, com referência aos desenhos associados caracterizado pelo fato que:

A figura 1A mostra uma cápsula de expressão resultante compreendendo promotor 35S (1A.1) do Vírus do Mosaico da Couve-flor, do elemento de melhoria translacional

ômega (1A.2) do TMV (Vírus do Mosaico do Tabaco), sinal almejado RE (1A.3), a sequência GCD humana (GCD) (também denotada por SEQ ID N0:7), sinal vacuolar (1A.4) e sequência terminadora (1A.5) da octopina-sintetase da *Agrobacterium tumefaciens*.

A figura 1B mostra um mapa esquemático da espinha dorsal plasmida pGreenII.

A figura 2 mostra análises por Western blot de extratos de célula hGCD transformadas usando anticorpos específicos anti hGCD. A Cerezyme padrão (curso 1) foi usado como um controle positivo, a calosidade não-transformada foi usada como controle negativo (curso 2), vários extratos de calosidades selecionadas são apresentadas nos cursos 3-8. As células transformadas expressam rGCD. 1 grama de tecido de calos foi homogeneizado e 15 microgramas de extrato celular solúvel foram rodados em SDS-PAGE. A expressão de rGCD em nos calos transformados e selecionados foi testada por análise Western Blot com anticorpos antihGCD específicos. 1: Cerezyme padrão, 2: extrato de calo não-transformado, 3 a 5: vários extratos de calos transformados e selecionados.

As figuras 3A, 3B e 3C mostram a primeira etapa da purificação de rhGCD em urna resina forte de troca de cátion (suporte alto-S Macro-Prep, Bio-Rad), comprimido em uma coluna XK (2.6x20cm). A coluna estava integrada com um sistema primeiro AKTA (Amersham Pharmacia Biotech) que permite a monitoria da condutividade, pH e absorvência a 280nm. A extração do rh-GCD foi obtida com divisor de equilíbrio contendo 600nM NaCl. A figura 3A representa uma série padrão desta etapa de purificação. As frações coletadas durante a série foram monitoradas por análise de atividade de

enzima, conforme apresentado na figura 3B, e a atividade enzimática de exibição de tubos (no pico da extração) foram coligadas. A figura 3C mostra um verniz azul brilhante de frações de extração analisadas por atividade.

As figuras 3D, 3E e 3F mostram gráficos correspondentes às figuras 3A, 3B e 3C, mas para a segunda coluna.

As figuras 4A, 4B e 4C mostram a etapa final de purificação do hGCD recombinante em uma resina de interação hidrofóbica (TSK gel, Toyopearl Pehyl-650C, Tosoh Corp.), comprimidas em uma coluna XK (2.6x20cm). A coluna foi integrada com um sistema primeiro AKTA (Amerisham Pharmacia Biotech) que permite a monitoração da condutividade, pH e absorvência a 280nm. A associação de extrações do GCD a partir da coluna anterior foi carregada a 6ml/min seguida por lavagem com divisor de equilíbrio até que a absorção UV atinja a linha de base. O GCD puro foi extraído por um divisor cítrico 10mM contendo 50% de etanol. A figura 4A representa uma série padrão da etapa de purificação; a figura 4B mostra as frações coletadas durante a série que foi monitorada pela análise de atividade da enzima; e a figura 4C mostra verniz azul brilhante de frações de extração analisadas por atividade.

As figuras 5A, 5B e 5C mostram a atividade da absorção seguinte da hGCD recombinante por macrófagos peritoneais, mais especificamente, a figura 5A ilustra um gráfico de influência de Mannan sobre a ingestão de rGCD, e as figuras 5B e 5C ilustram gráficos da Ingestão de GCD em macrófagos peritoneais por receptores de manose GCD (CB-mix1 = rGCD da presente invenção) Vs. Cerezyme®.

A figura 5D mostra um Western blot de GCD

recombinante de acordo com a presente invenção.

A figura 6 mostra estruturas de glicosilação para rGCD de acordo com a presente invenção e aquela da Cerezyme™, onde a estrutura A' se trata de uma estrutura principal de glicano de células CHO; a estrutura B' se tratada de uma estrutura principal de glicano de células de cenoura; e a estrutura C' se trata de uma remodelagem de glicano com glicosidades, onde a dita estrutura é uma estrutura principal remodelada de glicano em Cerezyme.

A figura 7 mostra as estruturas de glicosilação rGCD de acordo com a presente invenção.

As figuras 8A, 8B; 8C e 8D mostram estruturas de glicosilação N-glico adicionais rGCD de acordo com a presente invenção, salientando que a estrutura A apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1171,5$; a estrutura B apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1331,6$; a estrutura C apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1345,6$; a estrutura D apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1505,7$; a estrutura E apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1579,8$; a estrutura F apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1709,7$; a estrutura G apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1570,9$; a estrutura H apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1783,9$; a estrutura I apresenta urna massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1989,0$; a estrutura J apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 1997,0$; a estrutura K apresenta uma

massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 2130,0$; a estrutura L apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 2193,1$; a estrutura M apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 2375,2$; e a estrutura N apresenta uma massa monoisotópica teórica para íon molecular $[M + Na]^+ = 2375,2$.

[00110] As proteínas para uso farmacêutico foram tradicionalmente produzidas em sistemas de expressão mamífera e bacteriana. Nos últimos anos, um sistema de nova expressão promissor foi encontrado em vegetais. Devido à relativa simplicidade de introduzir novos genes e potencial produção de massa e peptídeos, o 'cultivo molecular' está se tornando gradativamente popular como um sistema de expressão proteica.

[00111] Uma das maiores diferenças entre os mamíferos e o sistema de expressão proteica vegetal é a variação das sequências de glicosilação de proteína causadas pelas diferenças nos caminhos biossintéticos. A glicosilação mostrou ter um profundo efeito na atividade, cruzamento, estabilidade, solubilidade, susceptibilidade para proteases, taxa de purificação sanguínea e potencial antigênico de proteínas. Assim, qualquer produção de proteína em vegetais deveria levar em consideração as ramificações potenciais da glicosilação vegetal.

[00112] A porção indefinida do carboidrato é um das modificações pós-translacionais mais comuns. A glicosilação protéica é dividida em duas categorias: conexão N e conexão O. Os dois tipos diferem em aminoácidos aos quais a divisão glican é ligada à proteína - as conexões N são ligadas aos resíduos Asn, enquanto que as conexões O são

ligadas aos resíduos Ser e Thr. Além disso, as sequências glicans de cada tipo produzem características diferenciadas. Dos dois tipos, a N-glicosilação é a mais abundante e seu efeito nas proteínas tem sido muito estudado. Os O-glicans, por outro lado, são relativamente escassos e há menos informação disponível a respeito de sua influência nas proteínas. A maioria dos dados disponíveis na glicosilação protéica nos vegetais concentra-se na conexão N ao invés de O-glicans.

[00113] A presente invenção descreve aqui um sistema de expressão vegetal baseado nas células de plantas transgênicas que são preferencialmente células raiz, opcionalmente e preferencialmente, cultivadas em suspensão.

[00114] Este sistema de expressão é particularmente criado para produção eficientes de uma proteína de alta manose de interesse. O termo "alta manose" inclui glicosilação tendo ao menos um resíduo de manose exposto.

[00115] Assim, em um primeiro aspecto, a presente invenção relaciona-se a uma célula hospedeira produzindo uma proteína recombinante de alta manose de interesse. Preferivelmente, a proteína recombinante apresenta um peptídeo sinal do RE (retículo endoplasmático), mais preferivelmente um peptídeo sinal tendo como alvo o RE. De maneira alternativa ou adicional, a proteína recombinante apresenta um sinal que faz com que a proteína contorne o Golgi. O sinal, preferencialmente, possibilita à proteína recombinante de apresentar glicosilação de alta manose, mais preferivelmente pela retenção de tal glicosilação e o mais preferível, tendo como alvo o RE e/ou contornando o Golgi.

Conforme descrito em maiores detalhes na presente, tal sinal é preferencialmente implementado como um peptídeo sinal que, mais preferivelmente, forma parte da sequência de proteína, opcionalmente e mais preferivelmente através do planejamento da proteína para também apresentar o peptídeo sinal como parte da proteína. Observa-se que o sinal pode opcionalmente ser um sinal alvo, um sinal de retenção, um sinal de evitação (contorno) ou qualquer combinação destas, ou qualquer outro tipo de sinal capaz de fornecer a estrutura glicosilação de alta manose desejada.

[00116] Sem desejar ser limitado a uma única hipótese, pareceria que o uso de um sinal de alvo RE com a proteína recombinante sendo produzida em cultura de célula vegetal era capaz de superar o transporte de Golgi, e assim, reter a glicosilação de alta manose desejada. De modo opcional, qualquer tipo de mecanismo que seja capaz de produzir glicosilação de alta manose, incluindo qualquer tipo de mecanismo para contornar o Golgi, pode ser usado de acordo com a presente invenção. Os peptídeos de sinal tendo como alvo RE são bem conhecidos na arte, eles são peptídeos de sinal terminal N. de modo opcional, qualquer peptídeo de sinal com alvo RE pode ser usado com a presente invenção.

[00117] Uma célula hospedeira, de acordo com a presente invenção, pode, de modo opcional, ser transformada ou transfectada (permanentemente e/ou transitoriamente) com uma molécula recombinante de ácido nucléico codificando uma proteína de interesse ou com um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucléico. Tal ácido nucléico compreende uma primeira sequência de ácido nucléico codificando a proteína de interesse, de modo opcional e de

preferência, de modo operável, conectada a uma segunda sequência de ácido nucléico codificando um peptídeo sinal com alvo vacuolar. Observa-se que, conforme aqui usado, o termo conectado 'de modo operável' não necessariamente refere-se a uma ligação física. A primeira sequência de ácido nucléico pode, de modo opcional e de preferência, ainda ser conectado de modo operável a uma terceira sequência de ácido nucléico codificando um peptídeo sinal com alvo RE (retículo endoplasmático). A célula hospedeira da invenção é caracterizada naquela em que a proteína de interesse é produzida pela célula em uma forma que inclua ao menos um resíduo manose exposto, mas é de preferência, uma forma altamente manosilada.

[00118] "Células", "células hospedeiras" ou "células hospedeiras recombinantes" são termos aqui usados de modo intercambiável. É entendido que tais termos não somente às células específicas do indivíduo, mas à progenia ou progenia potencial de tal célula. Em função de que certas modificações podem ocorrer em sucessão de geração, devido ou à mutação ou influências ambientais, tal progenia pode não, na verdade, ser idêntica à célula pai, mas ainda estão incluídas dentro do escopo do termo aqui usado. "Célula hospedeira", conforme aqui usado, refere-se às células que podem ser transformadas de modo recombinante com DNA livre ou vetores de expressão construídos usando técnicas recombinantes de DNA. Conforme aqui usado, o termo "transfecção" significa a introdução de um ácido nucléico, por exemplo, DNA livre ou vetor de expressão em células recipientes por transferência de gene mediado por ácido nucléico. "Transformação", conforme aqui usado refere-se a um

processo no qual um genótipo de célula é modificado como um resultado da absorção celular do DNA ou RNA exógeno, e, por exemplo, a célula transformada expressa uma forma recombinante da proteína desejada.

[00119] Avaliaria-se que uma resistência à droga ou outros marcadores selecionados é pretendido, em parte para facilitar a seleção dos transformantes. Ainda, a presença de um marcador selecionável, como um marcador de resistência à droga, pode ser de uso para manter os microorganismos contaminantes de multiplicação no meio da cultura. Tal cultura pura da célula hospedeira transformada seria obtida pela cultura das células sob condições que são requeridas pela sobrevivência do fenótipo induzido.

[00120] Conforme acima indicado, as células hospedeiras da invenção podem ser transfetadas ou transformadas com uma molécula de ácido nucléico. Conforme aqui usado, o termo "ácido nucléico" refere-se aos polinucleotídeos como ácido desoxirribonucleico (DNA) e, onde apropriado, o ácido ribonucleico (RISTA). Os termos também seriam incluídos, como equivalentes, análogos tanto do RNA quanto DNA feitos de análogos nucleotídeos e, conforma aplicável à configuração sendo descrita, polinucleotídeo de filamento único (como sentido e sem sentido) e filamento duplo.

[00121] Em ainda outra configuração, a célula hospedeira da invenção pode ser transfectada ou transformada com um vetor de expressão compreendendo uma molécula recombinante de ácido nucléico. "Vetores de Expressão", conforme aqui usados, circundam os vetores como plasmídeos, vírus, bacteriófago, fragmentos integráveis de DNA, e outros

veículos que possibilitam a integração dos fragmentos de DNA no genoma do hospedeiro. Os vetores de expressão são tipicamente construções de DNA e RNA auto replicantes compreendendo o gene desejado ou seus fragmentos, e de modo operacional, elementos de controle genético conectados que são reconhecidos em uma célula hospedeira adequada e a expressão de efeito dos genes desejados. Estes elementos de controle são capazes de expressão efetiva dentro de um hospedeiro adequado. De modo geral, os elementos de controle genético podem incluir um sistema de promotor procariótico ou um sistema de controle de expressão promotora eucariótica. Tal sistema, tipicamente, inclui um promotor transcrricional, um operador opcional para controlar o princípio da transcrição, fortalecedores de transcrição para elevar o nível de expressão de RNA, uma sequência que codifique um local de ligação de ribossomo adequado, uniões de RNA, sequências que terminam transcrição e a tradução e assim por diante. Os vetores de expressão normalmente contêm uma origem de replicante que permite que o vetor replique independentemente da célula hospedeira.

[00122] Os plasmídeos são os mais comumente usados a partir do vetor, mas outras formas de vetores que têm função equivalente e os quais são, ou se tornam, conhecidos na invenção e apropriados para o uso aqui citado. Veja, por exemplo, Pouwels et al. Cloning Vectors: a Laboratory Manual (1985 e complementos), Elsevier N. Y. e Rodriguez et al. (eds) Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and their uses, Buttersworth, Boston, Mass (1988), os quais estão aqui incorporados por referência.

[00123] Em geral, tais vetores contêm,

outrossim, genes específicos que tem capacidade de fornecer uma seleção fenotípica nas células transformadas. Estão também contemplados os usos vetores de expressão viral procarióticos e eucarióticos para expressar a codificação genética para os polipeptídios da presente invenção.

[00124] Opcionalmente, o vetor pode ser um vetor de planta geral (como descrito em relação aos exemplos abaixo). Em alternativa, o vetor pode, opcionalmente, ser específico para as células raiz.

[00125] Em uma configuração preferencial, as células hospedeiras da invenção podem ser células eucarióticas ou procarióticas.

[00126] Em uma configuração específica, a célula hospedeira da invenção é uma célula procariótica, de preferência, uma célula bacteriana e mais preferivelmente, uma célula de *Agrobacterium tumefaciens*.

[00127] Essas células são suadas infetar as células hospedeiras da planta preferencial, conforme descrito abaixo.

[00128] Em outra configuração preferencial, a célula hospedeira da invenção pode ser uma célula eucariótica, de preferência, uma célula de planta e mais preferivelmente uma célula raiz da planta, selecionada do grupo composto por uma célula de raiz de planta transformada de *Agrobacterium tumefaciens*, célula de aipo, célula de gengibre, célula de nabo e célula de cenoura.

[00129] Em uma configuração preferencial, a célula de raiz de planta é uma célula de cenoura. Deve ser ressaltado que as células transformadas de célula de cenoura da invenção são cultivadas em suspensão.

[00130] Como já mencionado acima e como descrito nos exemplos, estas células foram transformadas com as células *Agrobacterium tumefaciens* da invenção.

[00131] Os vetores de expressão ou moléculas de ácido nucléico recombinante usados para trans-infectar ou transferir as células hospedeiras da invenção podem ser modificadas ainda de acordo com métodos conhecidos em aquelas especializadas na arte para adicionar, remover ou, de outra maneira, modificar as sequências de sinal peptídeo para alterar a divisão peptídica do sinal ou para aumentar ou modificar o objetivo da enzima lisossômica expressa por meio do sistema da endomembrana da planta. Por exemplo, mas de nenhuma maneira limitando-o, a expressão "dispositivo" pode ser especificamente executada para objetivar a enzima lisossômica para secreção ou localização vacuolar, ou retenção no retículo endoplásmico (ER).

[00132] Em uma configuração, a expressão vetor ou molécula de ácido nucléico recombinante, pode ser expressa para incorporar uma sequência nucleotídica que codifique um sinal objetivando a enzima lisossômica para o vacúolo da planta. Por exemplo, e de nenhuma maneira limitando-o, a molécula de ácido nucléico recombinante contida dentro da célula hospedeira da invenção, contém uma primeira sequência de ácido nucléico, codificando uma enzima lisossômica a qual se encontra articulada operacionalmente com uma segunda sequência de ácido nucléico, codificando um peptídeo de um sinal objetivado vacuolar, do gene A da quitina do tabaco. Este peptídeo de sinal vacuolar tem a sequência do aminoácido como definido pela SEQ ID N° 2. A primeira sequência de ácido nucléico pode ser, opcionalmente, unida ainda, a uma ligação

com uma terceira sequência de ácido nucléico, codificando um ER (retículo endoplásmico), objetivando um peptídeo de sinal, como denotado na SEQ ID N° 1. Em uma configuração, a molécula de ácido nucléico recombinante inclusa dentro da célula hospedeira- da invenção compreende ainda um favorecedor que é funcional nas células das plantas. Este favorecedor deve estar operacionalmente ligado à molécula recombinante da invenção.

[00133] O termo "operacionalmente ligado(a)" é usado neste documento para indicar, que a primeira sequência de ácido nucléico está operacionalmente ligada à segunda sequência de ácido nucléico, quando a primeira sequência de ácido nucléico se encontra em relação funcional com a segunda sequência de ácido nucléico. Por exemplo, um favorecedor está operacionalmente ligado à uma sequência de codificação se o favorecedor afeta a transcrição ou expressão da sequência de codificação. Opcionalmente, e de preferência, as sequências de DNA ligadas operacionalmente são contíguas (por exemplo, estão ligadas fisicamente) e onde necessário para ligar duas regiões de codificação de proteínas na mesma estrutura de leitura. Assim, uma sequência de DNA e uma(s) sequência(s) regulatórias está(ão) conectada(s) de forma a permitirem a expressão do gene quando as moléculas corretas (por exemplo, as proteínas transcritpcionais ativadoras) estão ligadas à(s) sequência(s) regulatória(s).

[00134] Em outra configuração, a molécula de ácido nucléico recombinante pode, ainda, opcionalmente, incluir um terminador operacionalmente ligado o qual é, de preferência, funcional nas células de plantas.

[00135] A molécula de ácido nucléico

recombinante da invenção pode, opcionalmente, incluir ainda, controle adicional, favorecendo e elementos regulatórios e/ou marcadores selecionáveis. Deve ser levado em consideração que estes elementos regulatórios estão operacionalmente ligados à molécula recombinante.

[00136] Os elementos regulatórios que podem ser usados na expressão "dispositivos" incluem os favorecedores que podem tanto ser heterogêneos ou homogêneos à célula da planta. O facilitador pode ser um facilitador de planta ou um facilitador não de planta, o qual tem condições de direcionar transcrições de alto nível de uma sequência ligada nas células da planta e nas plantas. Os exemplos não-limitadores dos favorecedores das plantas que podem ser usados eficientemente na prática da invenção incluem o vírus do mosaico da couve-flor (CaMV)35S, rbcS, o facilitador para a proteína de ligação da clorofila a/b, AdhL, NOS e HMG2, ou suas modificações ou derivados. O facilitador pode ser, também, constitutivo ou induzível. Por exemplo, mas não limitador de, um facilitador induzível pode ser um facilitador que facilita a expressão ou a expressão aumentada da sequência nucleotídica da enzima lisossômica depois da ativação do gene mecânico (MGA) da planta, tecido da planta ou célula da planta.

[00137] Os vetores de expressão usados para trans-infectar ou transformar as células hospedeiras da invenção podem ser modificados adicionalmente de acordo com os métodos conhecidos a aqueles que têm experiência em melhorar ou em aprimorar a expressão dos genes heterólogos nas plantas e nas células das plantas. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas a, os elementos regulatórios

do DNA mutante para aumentar a potência dos favorecedores ou para modificar a proteína de interesse.

[00138] Em uma configuração preferencial, a elevada proteína manose de interesse, produzida pela célula hospedeira da invenção pode ser uma glico-proteína elevada de manose que tenha, pelo menos, um resíduo de manose exposto (pelo menos um resíduo terminal de manose).

[00139] Essa proteína elevada de manose pode estar de acordo com outra configuração preferencial, uma enzima lisossômica selecionada do grupo composto por ácido glucocerebrosídeo (GCD), esfingomielase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduridase, sulfatase iduronada, α -manosidase e sialidase.

[00140] O termo "enzima lisossômica", na forma como aqui empregado em relação a tal enzima e produto produzido no sistema de expressão da planta descrito pela invenção, diz respeito a um peptídeo recombinante expresso em uma célula de planta transgênica a partir de uma sequência nucleotídica, codificando uma enzima lisossômica humana ou animal, uma enzima lisossômica animal ou humana modificada, ou um fragmento, derivativo, ou modificação dessa enzima. As enzimas lisossômicas animais ou humanas modificadas incluem, mas não estão limitadas a, as enzimas lisossômicas animais ou humanas que têm um ou várias adições de aminoácidos introduzidos artificialmente ou ocorrendo naturalmente, anulações e/ou substituições.

[00141] As enzimas lisossômicas solúveis compartilham as etapas iniciais da bio-síntese com as proteínas de secreção, ou seja, a síntese ou o ribossomo,

unindo o peptídeo do sinal do N-terminal com a superfície áspera do retículo endoplásmico (ER), transportando-os dentro do lume do ER onde o peptídeo do sinal é elevado e adicionando os oligossacarídeos a resíduos específicos de aspargina (Ligados em N), seguido de modificações adicionais da proteína nascente no aparelho de Golgi (von Figura e Hasilik, Annu Rev. Biochem 55:167-193(1986)]. Os oligossacarídeos ligados em N podem ser complexos, diversos e heterogêneos e podem conter resíduos de manose elevada. As proteínas passam por processos adicionais em um compartimento pós-ER, pré-Golgi e no cis-Golgi para formar tanto a manose ligada em N 6-fosfato (M-6-P) dependente de oligossacarídeos como um sinal de reconhecimento do M-6-P independente do oligossacarídeo para as enzimas localizadas lisossômicas [Kornfeld & Mellman, Ann. Rev. Cell. Biol., 5:483-525 (1989); Kaplan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2026 (1977)]. A presença de um sinal de reconhecimento de M-6-P resulta na ligação da enzima aos receptores de M-6-P (MPR). Estas enzimas ligadas permanecem na célula, são eventualmente embaladas dentro dos lisossomos e são, assim, segregadas das proteínas alvo para a secreção ou para a membrana de plasma.

[00142] Na configuração preferencial, a enzima lisossômica pode ser a glucocerebrosidase (GCD) humana.

[00143] Ainda, em uma configuração específica, esta célula hospedeira preferencial é transformada ou trans-infectada por uma molécula de ácido nucléico recombinante a qual inclui ainda vim facilitador ³⁵S do vírus de mosaico da couve-flor, preferencialmente, tendo uma sequência de ácido nucléico, como mostrado pela SEQ ID nº 9, um terminador da sintase octopina do *Agrobacterium tumefaciens*, tendo, de

preferência, a sequência do ácido nucléico, como identificado pela SEQ ID N° 12 e elemento melhorador de interpretação TMV Omega (Vírus do mosaico do tabaco). De acordo com a configuração preferencial, esta molécula ácido nucléico recombinante inclui a sequência de ácido nucléico, substancialmente, como identificado pela SEQ ID N° 13, e codifica a manose alta GCD, tendo a sequência do aminoácido, substancialmente, como identificado em SEQ ID N° 14.

[00144] Seria de grande valor que a presente invenção fornecesse ainda para um vetor de expressão incluindo uma molécula de ácido nucléico, codificando uma enzima lisossômica de manose alta, ativa biologicamente.

[00145] Em uma configuração preferencial do aspecto, o vetor de expressão da invenção inclui uma molécula de ácido nucléico codificando uma glucocerebrosidase humana de manose alta, biologicamente ativa (GCD). De preferência, este vetor de expressão preferencial inclui uma molécula de ácido nucléico recombinante a qual tem uma sequência de ácido nucléico substancialmente como descrito em SEQ ID N° 13. De acordo com a configuração específica, um vetor de expressão preferencial utiliza o plasmídeo pGREEN II, como descrito no Exemplo I a seguir.

[00146] Deve ser, ainda, levado em consideração que a invenção sustenta um estojo de expressão incluso no vetor de expressão descrito acima.

[00147] Em um segundo aspecto, a presente invenção diz respeito a uma proteína de manose alta recombinante, produzida pela célula hospedeira da invenção.

[00148] Em uma configuração preferencial, esta proteína de manose alta pode ser uma enzima lisossômica de

manose alta biologicamente ativa, selecionada a partir do grupo composto por glucocerebrosidase (GCD), ácido sfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduridase, sulfatase iduronada, α -manosidase e sialidase. Mais preferivelmente, esta enzima lisossômica pode ser uma glucocerebrosidase (GCD) humana.

[00149] O termo "biologicamente ativo(a)" é usado neste documento em relação a qualquer enzima lisossômica recombinante produzida em um sistema de expressão de planta para significar que a enzima lisossômica recombinante tem condições de hidrolisar tanto o substrato natural, ou um substrato análogo, ou um sintético da correspondente enzima lisossômica humana ou animal, em níveis identificáveis.

[00150] Ainda, a invenção apresenta uma enzima lisossômica de manose alto, biologicamente ativa, que tem, pelo menos uma cadeia de oligossacarídeos, incluindo um resíduo de manose.

[00151] De acordo com uma configuração preferencial, a enzima lisossômica recombinante da invenção pode se ligar ao receptor de manose sobre uma célula alvo em um local alvo. De preferência, este local pode estar em um sujeito que sofre de doença de armazenamento de lisossômico.

[00152] Opcionalmente, e ainda preferencialmente, a enzima lisossômica recombinante tem alta afinidade com a célula alvo, quando comparada à afinidade correspondente da enzima lisossômica que ocorre naturalmente para a célula alvo. Em uma configuração específica, a célula alvo no local alvo pode ser uma célula de Kupffer no fígado do sujeito.

[00153] Em uma configuração preferencial, a enzima lisossômica recombinante pode ser selecionada do grupo composto por glucocerebrosidase (GCD), ácido sfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduridase, sulfatase íduronada, α -manosidase e sialidase.

[00154] Preferencialmente, esta enzima lisossômica recombinante é a glucocerebrosidase (GCD).

[00155] Em um terceiro aspecto, a invenção diz respeito a um método para produzir proteína de manose alta. De acordo com isto, o método da invenção inclui as etapas para: (a) preparar a cultura das células hospedeiras recombinantes, transformadas ou trans-infectadas com moléculas de ácido recombinante, codificando-se para proteína recombinante de interesse ou com um vetor de expressão incluindo as moléculas de ácido nucléico recombinante; (b) a cultura da cultura de células hospedeiras preparadas para a etapa (a) em suspensão, sob condições que permitam a expressão da proteína da manose alta, onde as células hospedeiras produzem a proteína de forma altamente manosilada; (c) a colheita das células da cultura obtida na etapa (a) e a recuperação da proteína das células e (d) a purificação da proteína da etapa (c) por meio de um método de purificação conveniente.

[00156] Opcionalmente e de preferência, a proteína recombinante pode ser produzida pelas células da planta, de acordo com a presente invenção, fazendo a cultura no dispositivo descrito em relação à patente USA nº 6.391.638, emitida em 21 de Maio de 2002 e incorporada a este documento por referência, como se tivesse sido totalmente aqui mostrada.

As condições de cultura em suspensão das células de plantas, com este dispositivo, estão descritas de conformidade com o requerimento de patente USA denominado "DISPOSITIVO, SISTEMA E MÉTODO DE CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS" de um dos inventores desta invenção e de titularidade conjunta com este requerimento, o qual é incorporado em referência como se tivesse sido totalmente mostrado e o qual foi requerido na mesma data deste requerimento.

[00157] Um exemplo específico, mas não limitador, para a recuperação e purificação da proteína da manose alta de interesse, produzida de acordo com o método da invenção pode ser encontrado nos seguintes exemplos. Os exemplos mostram que o h-GCD recombinante produzido pela invenção ligou-se inesperadamente a urna membrana interna das células transformadas de cenoura da invenção e não segregadas no meio. O rh-GCD solúvel pode ser separado dos detritos das células em outro componente não-solúvel, de acordo com os meios conhecidos na arte, tais como o filtrado do precipitado. Por exemplo, seguindo o ciclo congela-desgela, as células passam por quebras e liberações de proteínas solúveis intracelulares, considerando que o h-GCD permanece ligado aos detritos da membrana insolúvel. Esta mistura de detritos de membrana solúvel e insolúvel foi posteriormente centrifugada e a fração solúvel foi retirada simplificando assim a purificação. O limite da membrana h- GCD pode ser, posteriormente, dissolvido por meio de interrupção mecânica com o auxílio de um detergente suave, inibidores da protase e reagentes de oxidação neutralizantes. A enzima solúvel pode ser ainda purificada usando técnicas de cromatografia, ' tais como a troca de cátions e interação hidrofóbica das colunas

de interação. Durante a produção de rh-GCD no bioreator e durante o processo de purificação a identidade do h-GCD, a atividade das enzimas, pureza e produção podem ser determinadas por meio de um ou mais ensaios bioquímicos, incluindo, mas não limitado a, a hidrólise de identificação' do substrato da enzima ou um análogo de substrato, a análise do da eletroforese do gel SDS-poliacrilamida e a análises imunológicas tais como ELISA e Western Blot.

[00158] De acordo com a configuração preferencial, a célula hospedeira, por este método, inclui a célula hospedeira da invenção.

[00159] Em outra configuração preferencial a proteína de manose alta produzida pelo método da invenção pode ser uma enzima lisossômica de manose alta biologicamente ativa, tendo, pelo menos, uma cadeia de oligossacarídeos incluindo o resíduo exposto de manose.

[00160] Esta enzima recombinante pode se unir a um receptor de manose na célula alvo, em um local alvo. Mais especificamente, a enzima recombinante produzida pelo método da invenção tem afinidade aumentada com a célula alvo, quando comparada à afinidade correspondente com a enzima lisossômica que ocorre naturalmente na célula alvo. De acordo com isto, a célula alvo, no local alvo, pode ser uma célula de Kupffer no fígado do sujeito.

[00161] Em uma configuração específica, a enzima lisossômica pode ser selecionada a partir de um grupo composto por glucocerebrosidase (GCD), ácido sfingomielinase, hexosaminidase, α -N-acetilgalactosaminidase, lipase ácida, α -galactosidase, glicocerebrosidase, α -L-iduridase, sulfatase iduronada, α -manosidase e sialidase. Mais preferivelmente,

esta enzima lisossômica pode ser uma glucocerebrosidase (GCD).

[00162] Em outra configuração preferencial a célula hospedeira usada pelo método desta invenção pode ser uma célula de uma raiz de uma planta, selecionada de um grupo composto por células de raiz transformadas de *Agrobacterium rhizogenes*, células de aipo, células de gengibre, células de nabo e células de cenoura.

[00163] De preferência, a célula da raiz da planta é uma célula de cenoura. Deve ser especificamente levado em consideração que as células transformadas de raiz de cenoura crescem em suspensão.

[00164] Em outro aspecto ainda, a presente invenção diz respeito ao método para tratar um sujeito, de preferência um sujeito mamífero, que tenha doença de armazenagem lisossômica, usando enzimas lisossômicas recombinantes exógenas.

[00165] Revelado e descrito, deve-se entender que esta invenção não está limitada a exemplos específicos, etapas de processo, e materiais expostos no presente assim como tal, as etapas de processos e materiais podem variar de alguma maneira. Deve-se entender também que a terminologia utilizada com o objetivo de descrever configurações específicas apenas e não possuem a intenção de limitar visto que o escopo da presente invenção será limitada somente pelas reivindicações anexas e equivalentes da mesma.

[00166] Em toda esta especificação e nas reivindicações que seguem, a não ser que o contexto exija diferentemente, a palavra "incluir" e suas variações, como "inclui" e "incluindo", serão entendidas como implicando a

inclusão de um todo ou de uma etapa ou grupo de uma totalidade ou etapas, mas não a exclusão de outra totalidade ou etapa, ou totalidades ou etapas.

[00167] Deve ser levado em consideração que, como usado nesta especificação e nas reivindicações em anexo, as formas no singular de "um", "uma" e "o" ou "a" incluem suas formas no plural, a não ser que o conteúdo especificamente dite de outra maneira.

[00168] Os seguintes exemplos são representativos das técnicas usadas pelos inventores na realização dos aspectos da presente invenção. Deve ser levado em consideração que embora essas técnicas sejam exemplares de configurações preferíveis para a prática da invenção, aqueles com habilidade na técnica, à luz da presente revelação, reconhecerão que inúmeras modificações podem ser realizadas sem se afastar do espírito e da finalidade primária da invenção.

Exemplos

Procedimentos experimentais:

Vetores plasmídeos:

*CE-T - Foi construído de CE plasmídeo obtido pelo Prof. Galil [Patente dos Estados Unidos 5.367.110 de 22 de Novembro (1994)]

O CE plasmídeo foi dissolvido com SaI.

[00169] A extremidade coesiva de Sali foi tornada rombuda usando o fragmento grande de DNA polimerase I. Então, o plasmídeo foi digerido com PstI e ligado a um fragmento de DNA codificando para o sinal de direcionamento de ER do gene endoquitinase básico [Arabidopsisthaliana] ATGAAGACTAATCTTTTTCTCTTCTCATCTTTTCA.

[00170] CTTCTCCTATCATTATCCTCGGCCGAATTC e
 sinal de direcionamento vacuolar de Tabaco quitinase A:
 GATCTTTTAGTCGATACTATG digerido com SmaI e PstI.

* pGREENII - obtido do Dr. P. Mullineaux [Roger P.
 Hellens et al., (2000) Plant Mol. Bio. 42:819-832].

Expressão do vetor pGREEN II é controlada pelo promotor 35X
 do Vírus Mosaico da Couve-flor, o elemento de aumento de
 tradução omega TMV (Vírus Mosaico do Tabaco) e a sequência
 terminadora de octopina sintase do *Agrobacterium tumefaciens*.
 cDNA

hGCD - obtido do ATCC (Nº de acesso 65696), GC-2.2 [GCS-2kb,
 lambda-BZZ-gama3 *Homo sapiens*] contendo glicosidase beta
 ácido [glicocerebrosidase]. Comprimentos de inserção [kb] 2;
 20; Tecido: célula fibroblasto WI-38.

CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO

[00171] O cDNA codificando para hGCD (número
 de clone ATCC 65696) foi amplificado usando o seguinte:
 primers 5' CAGAATTCGCCCCGCCCTGCA 3' e o inverso: 5'
 CTCAGATCTTGGCGATGCCACA 3'.

[00172] O produto de PCR DNA purificado foi
 digerido com endonucleases EcoRI e BglII (veja sequências de
 reconhecimento sublinhadas nos primers) e ligado a um vetor
 intermediário tendo um cassete de expressão E-T digerido com
 as mesmas enzimas. O cassete de expressão foi cortado e eluído
 do vetor intermediário e ligado no vetor binário pGREENII
 usando enzimas de restrição SmaI e XbaI, formando o vetor de
 expressão final. Resistência à canamicina é conferida pelo
 gene NPTIII acionado pelo promotor 'nos' obtido junto com o
 vetor pGREEN (Figura 1B). O cassete de expressão resultante
 é apresentado pela Figura 1A.

[00173] O plasmídeo resultante foi sequenciado para garantir fusão correta na moldura dos sinais usando os seguintes primers de sequência: promotor 5' 35S: 5' CTCAG AAGAC C AG AGGGC 3', e o finalizador 3': 5' CAAAGCGGCCATCGTGC 3'.

[00174] Determinação de calos de cenoura e culturas de suspensão de célula A determinação de calo de cenoura e culturas de suspensão de célula foi executada conforme descrito anteriormente por Torres K.C. (Tissue culture techniques for horticultural crops, pág. 111, 169).

[00175] Transformação de células de cenoura e isolamento de células transformadas.

[00176] A transformação de células de cenoura foi executada usando transformação de *Agrobacterium* por uma adaptação de um método descrito anteriormente [Wurtele, E.S. e Bulka, K. Plant Sci, 61:253-262 (1989)]. Células crescendo em meio líquido foram usadas durante todo o processo ao invés de incubação de calos e os tempos de crescimento foram adaptados para a transformação de células na cultura líquida. Brevemente, *Agrobacteria* foram transformadas com o vetor pGREEN II por eletroforese [den Dulk-Ra, A. e Hooykaas, P.J. (1995) Methods Mol. Biol. 55:63-72] e então selecionadas usando antibiótico paromomicina 30 mg/ml. As células de cenoura transformadas com *Agrobacteria* e selecionadas usando antibiótico paromomicina a 60 mg/ml em meio líquido. Exploração de células de cenoura transformadas para isolamento de calos expressando altos níveis de GCD.

[00177] 14 dias após a transformação, as células da cultura foram laminadas em meio sólido em uma diluição de 3% de volume de célula empacotada para a formação

de calos de agrupamentos individuais de células. Quando calos individuais atingiram 1-2cm de diâmetro, as células foram homogeneizadas em tampão de amostra SDS e os extratos de proteína resultantes foram separados no SDS-PAGE [Laemmli U., (1970) Nature 227:680-685] e transferidas para membrana de nitrocelulose (Nitrocelulose hybond C, 0,45 micron. Catálogo N°: RPN203C, da Amersham Life Science). Mancha Ocidental para detecção de GCD foi executada usando anticorpos policlonais anti-hGCD (descritos aqui abaixo). Calos expressando níveis significativos de GCD foram expandidos e transferidos para crescimento em meio líquido para progressão, purificação de proteína e análise. Preparação de anticorpos policlonais.

[00178] 75 microgramas de GCD recombinante (Cerezyme™) foram suspensos em 3 ml de adjuvante de Freund completo e injetados em cada um de dois coelhos. Cada coelho foi provido com uma injeção após duas semanas. Os coelhos foram sangrados aproximadamente 10 dias após a injeção e novamente em intervalos semanais até que o título do anticorpo começasse a cair. Após a remoção do coágulo, o soro foi dividido em alíquotas e armazenado a -20°C.

Progressão do crescimento da cultura em um biorreator.

[00179] Um calo de aproximadamente 1 cm de células de cenoura geneticamente modificada contendo o gene rh-GCD foi laminado em uma lâmina de meio de ágar Murashige e Skoog (MS) de 9 cm de diâmetro contendo 4,4 g/l de meio MSD (Duchefa), 9,9 g/l de tiamina HCl (Duchefa), 0,5 mg de ácido fólico (Sigma) 0,5 mg/l de biotina (Duchefa), 0,8 g/l de hidrolisado de caseína (Ducifa), açúcar 30 g/l e hormônios 2,4-D (Sigma). O calo foi cultivado durante 14 dias a 25°C.

[00180] Cultura de célula em suspensão foi preparada pela sub-cultura do calo transformado em um meio líquido MSD (Murashige&Skoog (1962) contendo 0,2 mg/l de ácido 2,4-dicloroacético), como é bem conhecido na técnica. As células em suspensão foram cultivadas em frasco Erlenmeyer de 250 ml (volume de trabalho inicia com 25 ml e após 7 dias aumenta para 50 ml) a 25°C com velocidade de agitação de 60 rpm. Subsequentemente, o volume de cultura de célula foi aumentado para Erlenmeyer de 1 L pela adição de volume de trabalho até 300 ml sob as mesmas condições. O inoculo do pequeno biorreator (10 L) [veja W098/13469] contendo 4 L de meio MSD, foi obtido pela adição de 400 ml de células em suspensão derivadas de dois Erlenmeyer de 1L que foram cultivados durante sete dias. Após uma semana de cultivo a 25°C com fluxo de ar de 1Lpm, meio MDS foi adicionado até 10L e a cultura continuou sob as mesmas condições. Após cinco dias adicionais de cultura, a maioria das células foi colhida e coletada pela passagem do meio de célula através de rede de 80^µm. O meio extra foi espremido e o bolo de célula empacotado foi armazenado em -70°C.

[00181] Detalhes adicionais do dispositivo de biorreator podem ser encontrados com relação à Patente Norte-Americana Nº 6.391.638, emitida em 21 de maio de 2002 e previamente incorporada por referência.

Purificação de proteína

[00182] De modo a separar o meio do GCD insolúvel, o bolo de células congeladas contendo - aproximadamente 100 g de peso úmido de células foi descongelado, seguido por centrifugação das células descongeladas a 17000xg durante 20 min. a 4°C. Os materiais

insolúveis e as células intactas foram lavados por re-suspensão em 100 ml de tampão de lavagem (20 mM de fosfato de sódio, pH 7,2, 20 mM EDTA) , e então precipitados por centrifugação a 17 000g durante 2 0 min a 4°C. o rh-GCD (GCD humano recombinante) foi extraído e solubilizado por homogeneização da conta em 200 ml de tampão de extração (20 mM de fosfato de sódio, pH 7,2, 20 mM EDTA, 1mM PMSF, 20 mM de ácido ascórbico, 3,8 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), 1 mM DTT e 1% de Triton-x-100). O homogeneizado foi, então, agitado durante 30 minutos na temperatura ambiente e clarificado por centrifugação a 17000xg durante 20 minutos a 4°C. A conta foi descartada e o pH do flutuante foi ajustado a um pH de 5,5 pela adição de ácido cítrico concentrado. A turbidez gerada após o ajuste do pH foi clarificada por centrifugação sob as mesmas condições descritas acima.

[00183] Purificação adicional foi executada por procedimento de colunas cromatográficas como segue: 200 ml de meio clarificado foram carregados em 20 ml de resina de troca catiônica forte (Suporte Macro-Prep high- S, Bio-Rad) equilibrada em 25 mM de tampão de citrato de sódio a um pH de 5,5, empacotada em uma coluna XK (2,6x20cm). A coluna foi integrada com um AKTA (sistema prime (Amersham Pharmacia Biotech) que permitiu monitorar a condutividade, pH e absorbância a 280 nm). A amostra foi carregada a 20ml/min., posteriormente a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (25 mM de tampão de citrato de sódio, pH 5,5) a uma taxa de fluxo de 12 ml/min. até a absorbância de UV atingir a linha basal. Pré-eluição do rh-GCD foi executada com tampão de equilíbrio contendo 200 mM de NaCl e a eluição foi obtida com tampão de equilíbrio contendo 600 mM de NaCl. As frações

coletadas durante a operação foram monitoradas quanto à análise de atividade de enzima, e tubos exibindo atividade enzimática (no pico de eluição) foram agrupados. Amostras agrupadas foram diluídas (1:5) em água contendo 5% de etanol e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH. A amostra contendo o rh-GCD foi aplicada na segunda coluna XK (1,6x20cm) empacotada com 10 ml da mesma resina da coluna anterior. A resina nesta coluna foi equilibrada com 20mM de tampão de citrato de pH 6,0 contendo 5% de etanol. Após a carga da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e o GCD foi eluído da coluna pelo tampão de eluição (20 mM de tampão de citrato, pH 6,0, 5% de etanol e 1M de NaCl). As frações do pico absorvente na etapa de eluição foram agrupadas e aplicadas em uma terceira coluna.

[00184] A etapa de purificação final foi executada em uma coluna XK (1,6x20cm) empacotada com 8ml de resina de interação hidrofóbica (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, TosohCorp.). A resina foi equilibrada em 10mM de tampão de citrato, pH 6,0, contendo 5% de etanol. O agrupamento de eluição de GCD da coluna anterior foi carregado a 6ml/min. seguido por lavagem com tampão de equilíbrio até o absorvente de UV atingir a linha basal. O GCD puro foi eluído por 10 mM de tampão cítrico contendo 50% de etanol, agrupado e armazenado a -20°C.

Determinação de concentração de proteína

[00185] Concentrações de proteína nos extratos de célula e frações foram analisadas pelo método de Lowry/Bradford (análise de proteína Bio-Rad) [Bradford, M., Anal. Biochem. (1976) 72:248] usando um padrão de albumina de soro bovino (fração V Sigma).

[00186] Alternativamente, a concentração das amostras de proteína homogêneas foi determinada por absorção a 280 nm, 1 mg/ml=1,4 O.D280- A pureza foi determinada pela proporção 280/260nm.

Análise de atividade de enzima GCD

[00187] A atividade enzimática de GCD foi determinada usando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosida (Sigma) como um substrato. Tampão de análise continha 60 mM de tampão fosfato-citrato, pH=6, 4mM de β -mercaptoetanol, 1,3mM de EDTA, 0,15% de Triton X-100, 0,125% de taurocolato de sódio. A análise foi executada em lâminas ELISA de 96 poços, 0-50 microlitros de amostra foram incubadas com 250 microlitros de tampão de análise e o substrato foi adicionado a concentração final de 4mM. A reação foi incubada a 37°C durante 60 minutos. Formação de produto (p-nitrofenil; pNP) foi detectada por absorbância a 405 nm. A absorbância a 405 nm foi monitorada a t=0 e no ponto final. Após 60 minutos, 6 microlitros de NaOH 5N foram adicionados a cada poço e a absorbância a 405 nm foi monitorada novamente. A curva de padrão de referência analisada em paralelo foi usada para concentrações quantitativas de GCD nas amostras testadas [Friedman et al., (1999) Blood, 93(9): 2807-16].

Análise Bioquímica:

Em proteólise de gel e análise de espectrometria de massa

[00188] As faixas de proteína manchadas no gel foram cortadas com lâmina de barbear limpa e as proteínas no gel foram reduzidas com 10mM de DTT e modificadas com 100 mM de iodoacetamida em 10mM de bicarbonato de amônio. Os pedaços de gel foram tratados com 10% de acetonitrila em 10mM de bicarbonato de amônio para remover a mancha das proteínas

seguida por secagem dos pedaços de gel. Os pedaços de gel secos foram reidratados com 10% de acetonitrila em 10mM de bicarbonato de amônio contendo aproximadamente 0,1µg de tripsina por amostra. Os pedaços de gel foram incubados durante uma noite a 37°C e os peptídeos resultantes foram recuperados com 60% de acetonitrila com 0,1% de trifluoroacetato.

[00189] Os peptídeos tripticos foram resolvidos por cromatografia de fase inversa em capilares de sílica fundida de 0,1x300mm (J&W, 100 micrômetros ID) preenchidas com R2 poroso (Perspective). Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente linear de 80 minutos de 5 a 95% de acetonitrila com 0,1% de ácido acético em água a uma taxa de fluxo de aproximadamente 1µl/minuto. O líquido da coluna foi eletro-pulverizado em um espectrômetro de massa de sifão de íon (LCQ, Finnegan, San Jose, CA). Espectrometria de massa foi executada no modo de íon positivo usando repetidamente varredura de MS total seguida por dissociação de indução de colisão (CID) do íon mais dominante selecionado da primeira varredura de MS. Os dados de espectrometria de massa foram comparados à proteólise simulada e CID das proteínas no banco de dados NR-NCBI usando o software Sequest [J. Eng and J. Yates, University of Washington and Finnegan, San Jose].

[00190] O terminal de amino da proteína foi sequenciado em Sequenciador de Peptídeo 494^a (Perkin Elmer) de acordo com as instruções do fabricante.

Absorção de GCD de macrófagos peritoneais

[00191] Direcionamento e absorção de GCD em macrófagos são conhecidos por serem mediados pelo receptor manose/N-acetilglicosamina e podem ser determinados usando

macrófagos peritoneais extraídos por tioglicolato obtidos de camundongos, conforme descrito por Stahl P. e Gordon S. [J. Cell biol. (1982) 93(1): 49-56]. Brevemente, camundongos (fêmea, cepa C57-B6) foram injetados intraperiotonealmente com 2,5 ml de meio 2,4% Bacto-tioglicolato sem dextrose (Difco Cat. N° 0363-17-2). Após 4-5 dias, camundongos tratados foram sacrificados por descolamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com solução salina tamponada com fosfato. As células foram transformadas em contas por centrifugação (1000xg 10 minutos) e foram suspensas novamente em DMEM (BeitHaemek, Israel) contendo 10% de soro de vitelo fetal. As células foram, então, laminadas em 1-2x10⁵ célula/poço em lâminas de cultura de tecido de 96 poços e incubadas a 37°C. Após 90 minutos, as células não aderidas foram eliminadas por lavagem três vezes usando PBS, e os macrófagos aderidos foram incubados durante 90 minutos a 37°C, em meio de cultura contendo quantidades especificadas de rhGCD, variando de 0 a 40 microgramas em 200 microlitros de volume final, na ausência e na presença de fermento "mannan" (2-10, 5 mg/ml). Após incubação, o meio contendo excesso de rGCD foi removido, e células foram lavadas três vezes com PBS e, então, lisadas com tampão de lise (10mM Tris pH=7,3, 1mM MgCl₂, 0,5% NP-40 e inibidores de protease). A atividade de rGCD assumida pelas células foi determinada pela submissão dos lisados de célula a análise de glicosidase in vitro conforme descrito acima.

EXEMPLO 1

CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO

[00192] Este Exemplo descreve a construção de um plasmídeo de expressão exemplificativo usado com relação

aos Exemplos abaixo, em maiores detalhes.

[00193] O cDNA codificando por hGCD (número de clone ATTC 65696) foi amplificado usando o seguinte: primers 5' CAGAATTCGCCCCGCCCTGCA 3' (também denotada por SEQ ID N°: 3) e o inverso: 5'CTCAGATCTTGGCGATGCCACA 3' (também denotada como SEQ ID N°: 4).

[00194] O produto PCR DNA purificado foi digerido com endonucleasesEcoRI e BglII (veja sequências de reconhecimento sublinhadas nos primers) e ligado em um vetor intermediário tendo um cassete de expressão CE-T digerido com as mesmas enzimas. CE-T inclui sinal de direcionamento ER MKTNLFLFLIFSLLSLSSAEF (também denotada por SEQ ID N°:1) do gene endoquitinase básico [Arabidopsisthaliana], e sinal de direcionamento vacuolar do Tabaco quitinase A: DLLVDTM* (também denotada por SEQ ID N°: 2).

[00195] O cassete de expressão foi cortado e eluído do vetor intermediário e ligado no vetor binário pGREENII usando enzimas de restrição Smal e Sbal, formando o vetor de expressão final. Resistência à canamicina é conferida pelo gene NPTII ativado pelo promotor 'nos' juntamente com o vetor pGREEN (Figura 1B). O cassete de expressão resultante é apresentado pela Figura 1A.

[00196] O plasmídeo resultante foi sequenciado para garantir fusão de moldura correta dos sinais usando os primers de sequenciamento a seguir:

[00197] Primer do promotor 5' 35S: 5' CTCAGAAGACCAGAGGGC 3' (também denotado por SEQ ID N°:5), e o terminador 3': 5' CAAAGCGGCCATCGTGC 3' (também denotado pela SEQ ID N°:6). O hGCD clonado verificado codificando a sequência é denotado por SEQ ID N°:7.

EXEMPLO 2

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE CENOURA E EXPLORAÇÃO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS EXPRESSANDO rhGCD

[00198] Este Exemplo descreve um método exemplificativo para transformar células de cenoura de acordo com a presente invenção, conforme usado nos Exemplos abaixo.

[00199] A transformação de células de cenoura foi executada por transformação de *Agrobacterium* conforme descrito anteriormente por [Wurtele e Bulka (1989) *ibid*]. Células de cenoura geneticamente modificadas foram laminadas em meio de ágar Murashige e Skoog (MS) com antibióticos para seleção de transformantes. Conforme mostrados pela Figura 2, extratos preparados de calos desenvolvidos, foram testados quanto à expressão de GCD por análise de mancha Ocidental usando anticorpo anti-hGCD, e foram comparados com padrão Cerezyme (controle positivo) e extratos de células não transformadas (controle negativo). Dos vários calos testados, um calo (número 22) foi selecionado para prosseguir o crescimento e para purificação de proteína.

[00200] A mancha Ocidental foi executada como segue.

[00201] Para esta análise, proteínas da amostra obtida foram separadas em eletroforese de gel de poliacrilamida SDS e transferidos para nitrocelulose. Para este objetivo, géis de poliacrilamida SDS foram preparados como segue. Os géis SDS consistem de um gel de empilhamento e um gel de resolução (de acordo com Laemmli, UK 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685).

[00202] A composição dos géis de resolução foi

como segue: 12% de acrilamida (Bio-Rad), 4 microlitros de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina; Número de catálogo Sigma T9281) por 10 ml de solução de gel, 0,1% SDS, 37,5 mM Tris-HCl, pH 8,8 e persulfato de amônio (APS), 0,1%. TEMED e persulfato de amônio foram usados neste contexto como iniciadores de radical livre para a polimerização. Aproximadamente 20 minutos após o início da polimerização, o gel de empilhamento (3% de acrilamida, 0,1% SDS, 12,6 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% APS e 5 microlitros de TEMED por 5 ml de solução de gel de empilhamento) foi colocado acima do gel de resolução, e um pente de 12 ou 18 espaços foi inserido para criar os poços para amostras.

[00203] As câmaras de anodo e cátodo foram preenchidas com solução de tampão idêntica: Tampão de tris glicina contendo SDS (Biorad, número de catálogo 161-0772), pH 8,3. O material contendo antígeno foi tratado com 0,5 volumes de tampão de carga da amostra (30 ml de glicerol) (número de catálogo Sigma G9012), 9% SDS, 15 ml de mercaptoetanol (número de catálogo Sigma M6250), 187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 500 microlitros de azul de bromofenol, todos os volumes por tampão de amostra de 100 ml), e a mistura então foi aquecida a 100°C por 5 minutos, e carregada para o monte de gel.

[00204] A eletroforese foi executada na temperatura ambiente pelo período adequado, por exemplo, 45 a 60 minutos usando uma força de corrente constante de 50 a 70 Volts seguida por 45 a 60 minutos a 180 a 200 Volts para gels de 13 até 9 cm de tamanho. Os antígenos foram então transferidos para nitrocelulose (Schleicher e Schuell, Dassel).

[00205] A transferência de proteína foi executada quase toda conforme ora descrito. O gel foi localizado, juntamente com a nitrocelulose adjacente, entre o papel de filtro 3 MM Whatmann, condutivo, material espumoso de 0,5 cm de espessura, e fios de eletrodos que conduzem a corrente por meio de eletrodos de platina. O papel do filtro, o material espumoso e a nitrocelulose foram completamente encharcadas no tampão de transferência (tampão TG da Biorad, número de catálogo 161-0771, diluído 10 vezes com tampão de metanol e água (20% metanol)). A transferência foi executada a 100 volts por 90 minutos a 4°C.

[00206] Após a transferência, locais ligados soltos sobre a nitrocelulose foram saturados, a 4°C a noite toda com tampão de fechamento contendo 1% de leite em pó (Laticínio América), e 0,1% Tween 20 (Sigma Cat P1379) diluídos com tampão de fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435). As faixas em borrão então foram incubadas, à temperatura ambiente por 1 hora, com um anticorpo secundário adequado (HRP de cabra anti-coelho (molécula inteira) (Catálogo Sigma número A-4914)), diluição 1:3000 em tampão contendo 1% de leite em pó (Laticínio América), e 0,1% Tween 20 (Sigma Cat P1379) diluído com tampão de fosfato (Riedel deHaen, número de catálogo 30435)). Depois de terem sido lavadas várias vezes com PBS, as faixas em borrão foram manchadas com reagentes desenvolvedores ECL (Amersham RPN 2209).

[00207] Depois da imersão dos borrões nos reagentes ECL, os borrões foram expostos ao filme de raios X FUJI Super RX 18x24, e desenvolvidos com desenvolvedor e fixador FUJI-ANATOMIX (fixador FUJI-X número de catálogo

FIXRTU 1 de 2). As faixas apresentando proteínas que estavam ligadas pelo anticorpo tornaram-se visíveis após este tratamento.

Crescimento em cultura de escala mais elevada em biorreatores.

[00208] Culturas de suspensão de calos 22 foram obtidas subcultivando-se calos transformados em um meio líquido. As células foram cultivadas agitando-se frascos Erlenmeyer, até que o volume total fosse suficiente para inocular o biorreator (conforme descrito em procedimentos experimentais). As células de cenoura transgênica modificadas geneticamente podem ser cultivadas por meses, e a colheita da célula pode ser obtida em ciclos de 5 a 7 dias (dados não mostrados). No 72 dia de cultivo, quando a quantidade da produção rh-GCD na célula de cenoura está no pico, as células são colhidas passando-se a cultura através de redes de 100 malhas. Deve-se notar que as células podem ser colhidas por meios conhecidos na técnica, tais como filtração ou centrifugação. O bolo da célula embalada, que provê o material para purificação de h-GCD para homogeneidade, pode ser armazenado a temperatura de congelamento.

EXEMPLO 3

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA HGCE ATIVA REAGRUPADA A PARTIR DE CÉLULAS DE CENOURA TRANSFORMADAS

[00209] Foi descoberto que a h-GCD reagrupada expressa em células de cenoura transformada era ligada às membranas internas das células e não segregada no meio. O rompimento da célula mecanicamente deixa a rGCD ligada aos fragmentos da membrana insolúveis (dados não mostrados), a rGCD foi então dissolvida usando-se detergentes suaves, e separada dos fragmentos da célula e demais componentes

insolúveis. A enzima solúvel foi mais purificada usando-se técnicas cromatográficas, inclusive troca de cátion e colunas cromatográficas de interação hidrofóbica, conforme descrito nos procedimentos experimentais.

[00210] A fim de separar o meio da GCD insolúvel, o bolo de célula congelada contendo 100 g de células de peso molhado foi degelado, seguido por uma centrifugação a 17 000xg por 20 minutos a 4°C. Os materiais insolúveis e as células intactas foram lavados por nova suspensão em tampão de lavagem de 100 ml (fosfato de sódio 20 mM de pH 7,2, 20 mM EDTA), e precipitados por centrifugação a 17000 g por 20 minutos a 4°C. A rGCD foi extraída e solubilizada pela homogeneização do grânulo em tampão de extração de 2 00ml (fosfato de sódio 20 mM de pH 7,2, EDTA 20mM, PMSF 1mM, ácido ascórbico 20Mm, polivinilpolipirrolidona (PVPP), DTT 1mM, 1% Triton-x-100 (Sigma)). A substância homogênea foi agitada por 30 minutos à temperatura ambiente e clareada por centrifugação a 17000g por 20 minutos a 4°C. O grânulo foi descartado e o pH do sobrenadante foi ajustado para pH 5,5, pelo acréscimo de ácido cítrico concentrado. A turvação gerada após o ajuste do pH foi clareada através de centrifugação nas mesmas condições descritas acima.

[00211] Outra purificação foi executada pelas colunas cromatográficas, conforme segue: em um primeiro estágio, 200ml de extrato clareado foram carregados em 10 ml de resina forte de troca de cátion (suporte alto-S Macro-Prep, bio-Rad) equilibrada em tampão de citrato de sódio de 25mM pH 5,5, embalado em uma coluna XK (2,6 x 20 cm). A coluna foi integrada com um sistema básico AKTA (Amersham Pharmacia

Biotech) que permitiu o monitoramento da condutividade, o pH e a absorção a 280 nm.

[00212] A amostra foi carregada a 20 ml/min., depois a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio (tampão de citrato de sódio a 25mM pH 5,5) à taxa de fluxo de 12ml/min até que a absorção de UV atingisse a linha básica. Foi executada a pré-eluição da rh-GCD com tampão de equilíbrio contendo 200mM NaCl e a eluição foi obtida com tampão de equilíbrio contendo 600mM NaCl. Frações coletadas durante a operação foram monitoradas pelo teste de atividade da enzima, e tubos mostrando a atividade enzimática (no pico da eluição) foram coletados. Amostras coletadas foram diluídas (1:5) em água contendo 5% de etanol e pH ajustado a 6,0 com NaOH.

[00213] A Fig. 3A representa uma operação padrão deste estágio de purificação. As frações coletadas durante a operação foram monitoradas pelo teste de atividade da enzima, conforme mostrado pela Fig. 3B, e a Fig. 3C mostra a mancha azul de Coomassie de frações da eluição testadas por atividade.

[00214] Frações de eluição contendo a rGCD foram aplicadas em uma segunda coluna XK (1,6 x 20cm) embalada com 10 ml da mesma resina, como na coluna anterior, para um segundo estágio' de purificação. A resina nesta coluna foi equilibrada com tampão de citrato de 2 0mM e pH 6,0 contendo 5% de etanol. Após a carga de amostra a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e a rGCD foi eluída a partir da coluna pelo tampão de eluição (tampão de citrato de 2 0mM e pH 6,0, 5% etanol e 1M NaCl). A Fig. 3D representa uma operação padrão deste estágio de purificação. As frações coletadas durante a operação foram monitoradas pelo teste de atividade da enzima,

conforme mostrado pela Figura 3E, e a Figura 3F mostra uma mancha azul de Coomassie de frações de eluição testadas por atividade.

[00215] As frações do pico absorvente no estágio de eluição foram coletadas e aplicadas em uma terceira coluna, para um terceiro estágio de purificação. O terceiro estágio de purificação foi executado em uma coluna XK (1,6 x 20 cm) embalada com 8ml de resina de interação hidrofóbica (gel TSK, Toyopearl Phenyl-650C, Tosoh Corp.). A resina foi equilibrada em 10mM de tampão de citrato e pH 6,0 contendo 5% de etanol. A coleta de eluição de GCD da coluna anterior foi carregada em 6 ml/min seguida de lavagem com tampão de equilíbrio até que a absorção de UV alcançasse a linha básica. A GCD pura foi eluída por 10mM de tampão cítrico contendo 50% de etanol, coletado e armazenado a - 20°C.

[00216] A figura 4A representa uma operação padrão deste estágio de purificação. As frações coletadas durante a operação foram monitoradas pelo teste de atividade da enzima (figura 4B), e a figura 4C mostra a mancha azul de Coomassie das frações de eluição testadas para atividade.

[00217] Em uma purificação de lote das células que foram processadas, a proteína rGCD foi purificada até o nível maior do que 95%; se somente o primeiro e o terceiro estágios fossem executados, a pureza seria alcançada a um nível de cerca de 80% (resultados não mostrados).

Análise bioquímica

[00218] Para validar a identidade da rhGCD purificada, foi executada uma análise de Espectrômetro de Massa Espectrômetro de Massa (MSMS). Os resultados obtidos mostraram que 49% da cobertura da sequência da proteína que

se uniu à sequência de aminoácido prevista, com base no DNA do cassete de expressão, inclusive peptídeo líder e as sequências alvo.

Elevação e atividade de hGCD de reagrupamento em macrófagos peritoniais

[00219] Para determinar se a rhGCD produzida em cenoura foi ou não corretamente glicosilada e pode sofrer elevação pelas células alvo, e assim serem úteis para tratamento da doença de Gaucher, a capacidade da rhGCD de se ligar a, e ser elevada pelos macrófagos foi testada em seguida. O objetivo de rhGCD até macrófagos é mediado pelo receptor Mannose/N-acetilglucosamina (Man/GlcNAc) e pode ser determinado usando macrófagos peritoniais de tioglicolato eliciados. Conforme mostrado pela figura 5, a rGCD sofre elevação pelas células a um alto nível. A Figura 5A mostra a elevação pelas células da rGCD de acordo com a presente invenção com relação à concentração de mannan.

[00220] A figura 5A mostra a elevação a níveis comparáveis com Cerezyme™ (este preparo foi feito para 80% de pureza com apenas o primeiro e o terceiro estágios do processo de purificação descrito acima).

[00221] As figuras 5B e 5C mostram que a elevação da rGCE é a um nível mais alto que a Cerezyme™, pois este preparo foi feito para pureza maior do que 95%, com todos os três estágios do processo de purificação descritos acima.

[00222] Com relação à figura 5C, claramente a porcentagem da atividade específica da atividade total, inibida por 4 mg/ml de mannan, é mais alta para a GCD da presente invenção (rGCD ou reagrupamento humano GCD) do que para o produto atualmente disponível no mercado, conforme

segue: GCD (CB-mix1, que é a rGCD da presente invenção) - 75% Cerezyme - 65%.

[00223] Além disso, conforme mostrado pelas figuras, o acréscimo de mannan inibiu claramente a ligação da rGCD pelas células. Na concentração de 2mg/ml de mannan, a ligação de rGCD foi inibida por 50%.

[00224] Estes resultados mostram que mesmo sem remodelamento das estruturas de glican, a rhGCD expressada e purificada a partir das células da cenoura transformada, que sofreu elevação para células macrófagas alvo, especialmente através dos receptores Man/GlcNAc. Além do mais, a rhGCE reagrupada é ativa de forma enzimática.

[00225] A figura 5D mostra que a rhGCE também é reconhecida por um anticorpo anti-GCD em uma mancha ocidental, a rGCE se refere à proteína de acordo com a presente invenção, enquanto a GCD padrão (mostrada em 5, 10 e 25 ng por caminho) é GCD comercialmente comprada (Cerezyme®).

EXEMPLO 4

TESTE DE TOXICOLOGIA

[00226] O material obtido de acordo com o procedimento de purificação acima foi testado de acordo com os protocolos padrão de teste de toxicologia (Orientação para Indústria sobre Teste de Toxicidade Aguda de Dose Única para Farmacêuticos, Centro para Avaliação e Pesquisa de Medicamentos (CDER) PT 1 (61 FR 43934, 26 de agosto de 1996) e por ICH M3 (M) Estudos de Segurança Não Clínica para a Realização de Experiências Clínicas em Humanos para Farmacêuticos modificação CPMP/ICH/286/95, de 16 de novembro de 2000).

[00227] Camundongos receberam injeções conforme segue: Uma dose inicial de 1,8 mg/kg (dose clínica) foi seguida por doses de 9 e 18 mg/kg. Os grupos de teste incluíam seis camundongos (ICR CD-I; 3 machos e 3 fêmeas) para receber rGCD (em um transportador líquido apresentando tampão de citrato 25 mM, 150 mM NaCl, 0,01% Tween 80, 5% de etanol) de acordo com a presente invenção, e outros seis camundongos para serem tratados apenas com o transportador como um grupo de controle. Os camundongos foram então observados por 14 dias e receberam eutanásia. Nenhum dos camundongos morreu antes da eutanásia planejada. Nenhum dos camundongos mostrou algum efeito significativo causado pelo tratamento.

[00228] Não foi encontrado nenhum resultado patológico bruto e/ou alteração no peso do corpo em qualquer um dos camundongos.

EXEMPLO 5

ANÁLISE DE GLICOSILAÇÃO

[00229] Com referência aos Exemplos anteriores, foi realizada a análise das estruturas de glicanos presentes em rGCD produzidas conforme descrito. De acordo com a descrição mais detalhada abaixo, os resultados indicam que a maiores dos glicanos contêm resíduos terminais de manose, assim como estruturas elevadas de manose. De forma vantajosa, considerou-se que este produto de elevado teor de manose é biologicamente ativo e, portanto, não foram necessárias etapas adicionais para a sua ativação.

[00230] Os métodos a seguir foram usados para determinar a estrutura de glicosilação de hGCD recombinante produzido de acordo com os Exemplos apresentados acima. Resumidamente, as ligações monossacarídicas para os glicanos N- e O- foram

determinadas usando-se uma estratégia de hidrólise e de GC-MS. Este método calcula o tipo de ligação dos carboidratos para o peptídeo e a composição geral de monossacarídeo de uma glicoproteína. Com base na afirmação anterior e também nas relações entre vários monossacarídeos, este método pode sugerir os tipos de glicanos na glicoproteína. Esta informação é importante para estimar as possíveis estruturas de glicano presentes na proteína.

[00231] Foi realizada uma outra análise de oligossacarídeo, caracterizada pelo método, da população de N-glicano. Foram realizados o FAB-MS e MALDI- TOF MS, seguindo a digestão de alíquotas das amostras com tripsina e peptídeo: N-glicanase F (PNGaseF) e permetilação dos glicanos. Este método é usado para soltar e isolar carboidratos N-ligados a partir da glicoproteína com digestão enzimática. As massas das populações de glicano na mistura de glicano isolado são determinadas e as suas massas são comparadas com aquelas de estruturas conhecidas a partir de bases de dados e à luz da análise da composição de monossacarídeos. As estruturas propostas também se baseiam nos modelos de glicosilação do organismo-fonte.

[00232] Um outro método incluiu a análise da população de O-glicano seguindo a eliminação redutiva dos glicopeptídeos tratados por PNGase F e tripticos, dessalinização e permetilação. Os O-glicanos não são liberados por PNGase F. Entretanto, os glicanos que permanecem ligados aos peptídeos são, muito provavelmente, glicanos O-ligados. Esses glicanos são então liberados pela eliminação redutiva e sua massa é analisada.

[00233] A análise da composição de monossacarídeo

(resumida abaixo) revelou uma distribuição característica de hexoses, hexosaminas e pentoses características da glicosilação da planta. As relações entre GlcNac e Manose sugerem que as estruturas características N-ligadas sejam a população predominante de glicano.

[00234] A análise espectrométrica de massa dos N-glicanos a partir do hGCD produzido conforme descrito acima indica que a população predominante de N-glicano tem a composição de monossacarídeo "Pent.deoxiHex.Hex3.HexNAc2".

Materiais e Métodos

[00235] A análise foi realizada usando uma combinação de cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS), Bombardeamento de Átomo Rápido-Espectrometria de Massas (FAB-MS) e Extração Atrasada Espectrometria de Massas via Ionização/Desorção a Laser Assistida por Matriz no modo Tempo de Voo (DE-MALDI-TOF-MS).

[00236] Para a análise de oligossacarídeo, a população de N-Glicano foi analisada por FAB-MS e MALDI-TOF MS seguindo a digestão de alíquotas das amostras com tripsina e peptídeo N-glicanase F (PNGaseF) e permetilação dos glicanos. A população de O-glicano foi analisada seguindo a eliminação redutiva dos glicopeptídeos trípticos e tratados por PNGase F, dessalinização e permetilação.

[00237] As ligações de monossacarídeo para N-glicanos e O-glicanos foram determinadas usando-se uma hidrólise, estratégia GC-MS de derivatização.

DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Amostra

[00238] Para os frascos de amostra que foram recebidos, foram atribuídos os únicos números de amostra

descritos abaixo (tabela 1):

Tabela 1

Produto	Número de referência
Glucocerebrosidase. Quatro tubos contendo 1 ml de amostra cada um, com uma concentração declarada de 0,8mg/ml em 25mM de tampão de Citrato pH6,0,0,01% Tween 80	62995 62996 62997 62998

As amostras foram armazenadas entre -10 e -30°C até que fossem solicitadas.

Química da Proteína

Diálise de amostras intactas

[00239] Um frasco (contendo 1 ml de proteína em uma concentração declarada de 0,8mg/ml) foi injetada em uma caixa de diálise tipo Slide-A-Lyzer (peso molecular de corte 10kDa) e dialisada a 4°C por um período de 24 horas contra água, sendo que a água foi trocada 3 vezes. Seguindo a diálise, a amostra foi removida da caixa e liofilizada.

Digestão de tripsina das amostras intactas para peneiramento do oligossacarídeo

[00240] A amostra diálisada e liofilizada foi resuspensa em 50mM de tampão de bicarbonato de amônio ajustado para pH 8,4 com 10% aq. de amônia e digerida com tripsina tratada com TPCK durante 4 horas a 37 °C, de acordo com os SOPs B001 e B003. A reação foi finalizada colocando-se em um bloco de aquecimento a 95°C por 2 minutos seguidos de liofilização.

Química de carboidrato

Digestão A de Peptídeo: N-Glicanase de Peptídeo

[00241] As misturas de peptídeo/ glicopeptídeo tipicamente divididas a partir da amostra de glicoproteína foram tratadas

com a enzima peptídeo: N-glicanase A (PNGaseA) em tampão de acetato de amônio, pH 5,5 a 37°C durante 15 horas. A reação foi paralisada por secagem de congelamento. Os produtos resultantes foram purificados utilizando-se um cartucho Sep-Pak C₁₈.

Eliminação redutiva

[00242] A fração Sep-Pak contendo glicopeptídeos O-ligados em potencial foi dissolvida em uma solução de borohidreto de sódio de 10mg/ml em 0,05M de hidróxido de sódio e encubado a 45°C durante 16 horas. A reação foi finalizada com a adição de ácido acético glacial.

Dessalinização de material eliminado de forma reduzida

[00243] Os carboidratos N-ligados em purificação na fração Sep-Pak de ácido acético 5% ag. e glicanos em potencial O-ligados liberados por eliminação redutiva foram permetilados usando-se o procedimento de hidróxido de sódio (NaOH)/iodeto metílico (MeI) (SOP B018). Uma parte da mistura de glicano permetilada N-ligada foi analisada por FAB-MS e MALDI-TOF MS e o restante foi submetido à análise de ligação. Análise de ligação do carboidrato N-ligado

Derivatização

[00244] As misturas de amostra de glicano permetilado obtidas seguindo-se a digestão A trípica e PNGase ou eliminação redutiva foram hidrolisadas (2M TFA, 2 horas a 120°C) e reduzidas (borodeuteride [borodeutério] de sódio (NaBD₄) em 2M NH₄OH, 2 horas em temperatura ambiente, SOP B025). O borato produzido na decomposição do borodeuteride [borodeutério] foi removido por 3 ações de uma mistura de metanol em ácido acético glacial (90:10) seguido de liofilização. As amostras foram então acetiladas usando-se

anidrido acético (1 hora a 100°C). As amostras acetiladas foram purificadas por extração em clorofórmio. Os acetatos de alditol metilados parcialmente foram então examinados por cromatografia/espectrometria de massas (GC/MS). Misturas padrões de acetatos de alditol parcialmente metilados e um ensaio em branco também foram realizados sob as mesmas condições.

Cromatografia Gasosa Líquida/Espectrometria de Massas (GC/MS)

[00245] Uma alíquota (1 µl) das amostras de carboidrato derivatizadas dissolvidas em hexano foram analisadas por GC/MS usando-se um espectrômetro de massas Perkin Elmer Turbomass Gold com um cromatógrafo gasoso de auto-sistema XL e um sistema de dados Dell sob as seguintes condições:

Cromatógrafo gasoso

Coluna: DB5

Injeção: Sobre-coluna

Temperatura do injetor: 40°C

Programa: 1 minuto a 40°C, depois 70°C/minuto para 100°C, mantido a 100°C durante 1 minuto, em seguida e 8°C/minuto para 290°C, finalmente mantido a 290°C por 5 minutos.

Gás transportador: Hélio

Espectrômetro de massas:

Voltagem de ionização: 70eV

Modo de aquisição: por scanner

Amplitude de massa: 35-450 Daltons

Resolução MS : Unidade

Análise do açúcar de glucocerebrosidase intacta

Derivatização

[00246] Uma alíquota equivalente de 500µg

de glucocerebrosidase foi liofilizada com 10µg de Arabitol como padrão interno. O resultado foi então metanolizado durante a noite a 80°C e secado sob nitrogênio. Os monossacarídeos liberados foram N-reacetilados usando-se uma solução de metanol, piridina e anidrido acético, secados sob nitrogênio novamente e convertidos em seus derivados de trimetilsilil (TMS) de acordo com o SOP B023. Os derivados TMS foram reduzidos em volume sob nitrogênio, dissolvidos em 2ml de hexano e sonificados durante 3 minutos. As amostras puderam então se equilibrar a 4°C durante a noite. Um ensaio em branco contendo 10µg de Arabitol e uma mistura padrão de monossacarídeo contendo 10µg cada de fucose, xilose, manose, galactose, glucose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico e Arabitol foram preparados paralelamente. Os derivados TMS foram então examinados por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS).

Cromatografia Gasosa Líquida/Espectrometria de Massas (GC/MS)

[00247] Uma alíquota (1µg) da amostra de carboidrato derivatizada dissolvida em hexano foi analisada por GC/MS usando-se um espectrômetro de massas Perkin Elmer Turbomass Gold com um cromatógrafo gasoso de Auto-sistema XL e um sistema de dados Dell sob as seguintes condições:

Cromatógrafo gasoso

Coluna: DB5 5

Injeção: Sobre-coluna

Temperatura do injetor: 40°C

Programa: 1 minuto a 90°C, depois 25°C/minuto para 140°C, 5°C/minuto para 220°C, finalmente 10°C/minuto para 300°C e mantido a 300°C durante 5 minutos.

Gás transportador: Hélio

Espectrômetro de massas:

Voltagem de ionização: 70eV

Modo de aquisição: por scanner

Amplitude de massa: 50-620 Daltons

Resolução MS: Unidade

Extração Atrasada Espectrometria de Massas via Ionização/Desorção a Laser Assistida por Matriz (DE-MALDI-MS) e Bombardeamento de Átomo Rápido-Espectrometria de Massas (FAB-MS)

[00248] A espectrometria de massa MALDI-TOF foi realizada usando um espectrômetro de massa de desorção a laser do Centro de Pesquisa de Bio-espectrometria Voyager STR acoplado com Extração Retardada (ER - DE, em inglês).

[00249] Glicanos permetilados secos foram dissolvidos em metanol: água (80:20) e analisados usando uma matriz de 2,5-ácido di-hidroxibenzóico. Bradiquinina, Angiotensina e ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) foram usados como calibradores externos.

[00250] Análises de espectrometria de massa de bombardeamento por átomos rápidos de íon positivo foram feitas em um espectrômetro de massa VG AutoSpecE de M-Scan, operando a $V_{acc} = 8\text{kV}$ para uma escala de massa de 4500 à sensibilidade total com uma definição de aproximadamente 2500. Um Injetor de íon de Césio foi usado para gerar os espectros que operam a 30kV. Esses espectros foram gravados em um sistema de dados VAX 3100 M76 usando o software Opus.

[00251] Glicanos permetilados secos foram dissolvidos em metanol e carregados em um alvo previamente manchado com 2-4pl de tioglicerol como matriz antes da

inserção na fonte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do açúcar de TMS de Glucocerebrosidase

Seleção de oligossacarídeos de ligação n

[00252] A glicoproteína intacta foi sujeitada à diálise seguida de digestão de tripsina e os produtos liofilizados foram digeridos usando-se PNGase A e então purificados pelo emprego de um Sep-Pak C₁₈. A fração do ácido acético de 5% ag. (que contém oligossacarídeo de ligação n) foi permetilada e os espectros de massa de FAB foram obtidos empregando-se uma parcela do oligossacarídeo derivado em uma baixa escala de massa para íons fragmentados e os espectros de massa DE-MALDI-TOF foram obtidos, por sua vez, com o emprego de uma parcela de oligossacarídeo derivativo em uma escala de massa elevada para íons moleculares.

Análise de N-glicanos originados de glucocerebrosidase

[00253] A tabela 1 lista os íons fragmentados predominantes no espectro FAB e íons moleculares presentes no espectro MALDI. A região do íon molecular (mostrada no Apêndice III) contém um sinal que predomina em 1505.8 m/z (compatível com um íon quasimolecular [M+Na]⁺, para uma estrutura que tem a composição Pent. deoxiHex. Hex₃. HexNAc₂). Uma escala de íons quasimoleculares menos intensos foi também detectada, compatível com as estruturas de manose complexa e elevada. As estruturas de manose elevada detectaram uma escala com tamanho de Hex₅. HexNAc₂, em 1579.8 m/z, a Hex₈. HexNAc₂, em 2193.0 m/z. Os sinais complexos são produzidos de N-glicanos processados menos extensivamente, como 1331.7 m/z (compatível com um íon quasimolecular [M+Na]⁺ para uma estrutura que tem a composição Pent.Hex₃.HexNAc₂) ou de um N-

glicano maior, por exemplo, 1751.0 m/z (compatível com um íon quasimolecular $[M+Na]^+$ para uma estrutura que tem a composição Pent.deoxiHex.Hex₃.HexNAC₃), 2375.4 m/z (compatível com um íon quasimolecular $[M+Na]^+$ para uma estrutura que tem a composição Pent. deoxiHex₂. Hex₄. HexNAC₄) e 2753.6 m/z (compatível com um íon quasimolecular $[M+Na]^+$ para uma estrutura que tem a composição Pent. deoxiHex₃. Hex₅. HexNAC₄).

[00254] O espectro de massa FAB fornece a informação a respeito das estruturas de antenas pela virtualidade de íons fragmentados na região de massa baixa do espectro (dados não mostrados). Os sinais foram detectados para identificar hexose (em 219 m/z) e HexNAC (em 260 m/z) como monossacarídeos terminais não-redutores nos N-glicanos. Tabela 2: Massas observadas no espectro permetilado de Glucocerebrosidase (número de referência 62996), que seguem a digestão de N-glicosidase tripsica e peptídea.

Sinais observados (m/z)	Atribuições possíveis
Massa baixa	
219	Hex ⁺
228	HexNAC ⁺ (- metanol)
260	HexNAC ⁺
Massa elevada	
1032.4	Pent.Hex ₃ .HexNAC ⁺
1171.5	Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1299.6	Eliminação de fucose de 1505.8 m/z
1331.6	Pent.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1345.6	DeoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1505.7	Pent.deoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1579.8	Hex ₅ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1709.9	Pent.deoxiHex.Hex ₄ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1750.9	Pent.deoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₃ OMe + Na ⁺
1783.9	Hex ₆ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1989.0	Hex ₇ .HexNAC ₂ OMe + Na ⁺
1997.0	Pent.deoxiHex.Hex ₃ .HexNAC ₄ OMe + Na ⁺
2027.0	Não determinado

Continuação da Tabela 2	
2099.0	Não determinado
2130.0	Pent.deoxiHex ₂ .Hex ₄ .HexNAc ₃ OMe + Na ⁺
2193.1	Hex ₃ .HexNAc ₂ OMe + Na ⁺
2375.2	Pent.deoxiHex ₂ .Hex ₄ .HexNAc ₄ OMe + Na ⁺
2753.4	Pent.deoxiHex ₃ .Hex ₅ .HexNAc ₄ OMe + Na ⁺

[00255] Todas as massas na coluna um são monoisotópicas, a menos que indicadas de outra maneira. Os números de massa não podem se relacionar diretamente aos dados brutos, enquanto o software atribui frequentemente números de massa aos picos do isótopo ¹³C, particularmente para massas acima de 1700Da.

Análise de ligação de N-glicanos de Glucocerebrosidase

[00256] A análise de ligação foi executada nos hidratos de carbono de ligação N liberados depois da digestão PNGase A, da purificação Sep-Pak e da permetilação.

[00257] Um complexo cromatograma foi obtido com alguns picos de impureza que se originaram dos reagentes derivativos. A comparação do tempo de retenção e dos espectros com misturas-padrão permitiu atribuições temporárias do açúcar, cujos picos estão alistados na Tabela 3.

[00258] Tabela 3: Tempos de retenção dos monossacarídeos ligados de diversas maneiras, detectados como seus acetatos de alditol, metilados parcialmente na análise GC-MS de Glucocerebrosidase (número de referência 62996) depois da digestão de N-glicosidase A tripsica e peptídea.

Compostos observados	Tempo de retenção (min) de Glucocerebrosidase (62996)
Xilose Terminal	10.41
Fucose Terminal	10.84
Manose Terminal	12.29 (principal)
Galactose Terminal	12.55

Continuação da Tabela 3	
Manose De ligação 2	13.40
Glucose De ligação 4	13.58
Manose De ligação 2,6	14.91
Manose De ligação 3,6	15.08
Manose De ligação 2,3,6	15.87
GlcNAc De ligação 4	16.73
GlcNAc De ligação 3,4	17.59

4.3. Seleção de oligossacarídeos de ligação O

[00259] A eliminação reduzida foi realizada na fração de 60% de 2-propanol (fração de glicopeptídeo de ligação O potencial) da purificação Sep-Pak de Glucocerebrosidase depois das digestões de tripsina e PNGase A. A amostra foi dessalinizada posteriormente ao término da reação e, após a remoção do borato, foi permetilada. Os espectros de massa FAB foram conseguidos com o emprego de uma porção dos oligossacarídeos derivados em uma escala de massa reduzida para íons fragmentados e espectros de massa DE-MALDI-TOF foram obtidos ao se utilizar uma porção dos oligossacarídeos derivados em uma escala de massa elevada para íons moleculares. Não foi observado nenhum sinal compatível com a presença de glicanos de ligação O (dados não mostrados).

Análise da ligação de O-glicanos de glucocerebrosidase

[00260] A análise da ligação foi realizada nos produtos de eliminação reduzida após a permetilação. Não foi observado nenhum sinal compatível com a presença de glicanos de ligação O típica (dados não mostrados).

[00261] A figura 6 mostra alguns exemplos de

estruturas de glicanos como uma comparação entre o GCD obtido de células CHO (Ovário de Hamster Chinês), que foram células de mamíferos (Cerezima™) e o GCD da criação presente, de células de cenoura. Como mostrado, a exige-se a reconstrução dessas estruturas para obter resíduos de manose expostos para Cerezima™. Pelo contraste, tais resíduos de manose expostos são obtidos diretamente para o GCD obtido das células vegetais de acordo com a criação atual, sem exigir manipulação adicional.

[00262] A figura 7 representa a estrutura do glicano principal encontrada em rGCD. Ela mostra também estruturas propostas de: a) a população de oligossacarídeos predominantes encontrados em hGC expressos em suspensão de células de cenoura (1505.7m/z); núcleo de ligação n típica; c) núcleo de ligação n de vegetais fucosilados. Os glicanos de ligação n são acoplados à proteína via-Asparagine e através da extremidade redutora do resíduo de GlcNac (GN), à direita dos diagramas. Os testes padrões de glicosilação da planta N, resíduos de fucose podem ser parte da estrutura do núcleo, ligado ao primeiro GlcNac que utiliza uma ligação glicosídica alfa(1-3), enquanto as estruturas de mamíferos usam tipicamente uma ligação glicosídica alfa(1-6).

[00263] As figuras 8A-8D mostram todas as estruturas possíveis para os N-glicanos detectados na proteína rGCD de acordo com a presente criação.

[00264] A estrutura de glicano dominante que foi identificada é a estrutura de glicano do núcleo encontrada na maior parte das glicoproteínas vegetais da ervilha, do arroz, do milho e de outras plantas comestíveis. Essa estrutura contém um resíduo de xilose do núcleo e também a fucose alfa-

(1-3) do núcleo. O trabalho realizado por Bardoret *al*(33) mostra que 50% dos doadores de sangue não alérgicos tiveram anticorpos específicos para o xilose do núcleo em seus soros e 25% tiveram anticorpos específicos para a fucose alfa-(1-3) do núcleo. Entretanto, deve ser estudado ainda se tais anticorpos puderam introduzir limitações ao uso de glicoproteínas biofarmacêuticas derivadas de plantas.

[00265] As populações de glicano menor de hGCD, produzido como acima descrito, eram principalmente as estruturas elevadas de manose de Hex4HexNAc2 à Hex8HexNAc2. Entre as estruturas complexas, foram exibidas estruturas como Pent.deoxiHex2.Hex4.HexNAc3 e Pent.deoxiHex3.Hex5.HexNAc3. Pent.Hex3.HexNAc2 foi detectada em proporções menores.

[00266] Os maiores monossacarídeos terminais foram a hexose (manose ou galactose) e a N-acetil-hexosamina, que são compatíveis com a presença de estruturas elevadas de manose e estruturas complexas processadas parcialmente.

[00267] No que diz respeito à seleção de oligossacarídeos de ligação 0, não foi observado nenhum sinal de que são compatíveis com glicanos de ligação 0. GCD é conhecido na técnica de não ter oligossacarídeos de ligação 0, como esses resultados são compatíveis com a glicosilação conhecida de GCD de outros sistemas celulares, incluindo GCD nativo e GCD recombinado, produzido em sistemas de cultura de mamíferos. Seja como for, na composição monossacarídea, foram detectados sinais compatíveis com Arabinose.

[00268] Um ponto importante, que diz respeito à presente invenção, é que a análise da composição de N-glicano da proteína hGCD mostrou que a maior parte dos N-glicanos termina com resíduos de manose. Isso vai ao encontro

da exigência para a manose que finaliza os N-glicanos que auxiliam a percepção do hGCD terapêutico pelo receptor da manose do macrófago. No entanto, nem GCD nativo nem a GCD recombinante produzidas nas células mamárias é manose alta. Portanto, a presente invenção derruba uma significativa barreira de proteínas, hGCD produzidas comercialmente, o que significa que essas proteínas são *modificadas* para acabar com os açúcares de manose, diferente da proteína produzida como descrito acima.

EXEMPLO 6

TRATAMENTO COM A PRESENTE INVENÇÃO

[00269] A proteína recombinante produzida de acordo com a presente invenção abrange, de preferência, uma proteína com glicosídeo apropriadamente produzida por uma cultura celular da planta, que é preferencialmente uma enzima lisossômica, por exemplo, e/ou uma proteína com glicosídeo de manose elevada.

[00270] Conforme configurações preferenciais aqui contidas, a proteína produzida de acordo com a presente invenção é apropriada para o tratamento de uma doença associada ao lisossomo, como uma doença de armazenamento lisossômico, por exemplo.

[00271] O método de tratamento compreende opcionalmente e preferencialmente: (a) fornecimento de um modelo recombinante biologicamente ativo de enzima lisossômica purificada a partir de células da raiz das plantas modificadas e que seja capaz de atingir eficientemente as células deficientes de forma anormal nas enzimas lisossômicas. Essa enzima recombinante biologicamente ativa expõe resíduos finais da manose em oligossacarídeo

adicionados; e (b) administração de uma quantidade efetiva de forma terapêutica da enzima lisossômica recombinante biologicamente ativa, ou de composição que abranja o mesmo sobre o assunto. Em uma configuração preferencial, a enzima lisossômica recombinante de manose elevada utilizada pelo método da invenção pode ser produzida pela célula hospedeira da invenção. Preferencialmente, essa célula hospedeira é uma célula de cenoura.

[00272] Por "sujeito mamífero" ou "paciente mamífero" entende-se qualquer mamífero para o qual a terapia genética seja desejada, inclusive humanos, bovinos, equinos, caninos e felinos, de preferência, um humano.

[00273] Deve-se notar que o termo "tratamento" inclui também a melhora ou o alívio de uma condição e/ou de um ou mais sintomas patológicos, curando tal condição, ou prevenindo a sua formação.

[00274] Em outras configurações preferenciais, a enzima lisossômica utilizada pelo método da invenção pode ser uma enzima de manose elevada que contenha, pelo menos, uma cadeia de oligossacarídeo com um resíduo de manose exposto. Essa enzima recombinante pode ser ligada a um receptor de manose em uma célula alvo, em um local alvo, dentro de uma matéria.

[00275] De maneira mais favorável, essa enzima lisossômica recombinante aumentou a afinidade com a célula alvo, em comparação à afinidade correspondente de uma enzima lisossômica que ocorre naturalmente com a célula alvo. Consequentemente, cada dose depende da seleção efetiva das células deficientes de forma anormal em GCD e cada dose desse modelo de GCD é substancialmente menor do que a dose de GCD

que ocorre naturalmente que seria, de outra forma, administrada de uma maneira similar para obter o efeito terapêutico.

[00276] Conforme as configurações preferenciais da presente invenção, a proteína é apropriada para o tratamento de doenças de armazenamento lisossômico, de maneira que a presente invenção compreenda também um método de tratamento para tais doenças. As doenças de armazenamento lisossômico constituem de um grupo de 40 enfermidades que são resultados de defeitos nas enzimas do código genético que quebram os produtos de resíduo glicolipídico ou polissacarídeo dentro dos lisossomos das células. Os produtos enzimáticos, por exemplo, açúcares e lipídios, são em seguida reciclados em novos produtos. Cada uma dessas enfermidades resulta de uma característica herdada recessiva ou ligada ao X que afeta os níveis de enzimas no lisossomo. Geralmente, não há uma atividade funcional ou biológica das enzimas afetadas nas células e tecidos dos indivíduos afetados. Em tais doenças a deficiência na função da enzima cria uma deposição sistêmica progressiva do substrato de carboidrato e lipídeo nos lisossomos nas células do corpo, eventualmente causando a perda da função do órgão e morte. A etiologia genética, as manifestações clínicas, a biologia molecular e a possibilidade das doenças de armazenamento lisossômico são detalhadas em Scriver et al. [Scriver et al., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7. ed. McGraw Hill, 1995. v. 11.]

[00277] Alguns exemplos das doenças do armazenamento lisossômico (e suas enzimas deficientes associadas) incluem, mas não são limitados à doença de Fabry

(α -galactosidase) e doença de Farber (ceramidase), doença de Gaucher (glucocerebrosidase), G_{m1} gangliosidosis (β -galactosidase, doença de Tay-Sachs (β -hexosaminidase), doença de Niemann-Pick (sphingomyelinase), doença de Schindler (α -N-acetylgalactosaminidase), síndrome de Hunter (iduronate-2-sulfatase), síndrome de Sly (B-glucuronidase), síndromes de Hurler e Hurler-Scheie (iduronidase), e síndrome de I-Cell/Sanfilippo (transportador de manose-6-fosfato).

[00278] A doença de Gaucher é a mais comum de armazenamento lisossômico em humanos, com a mais alta frequência encontrada na população Judia Ashkenazi. Cerca de 5 a 10 mil pessoas nos Estados Unidos estão com a doença [Grabowski, Adv. Hum. Genet. 21:377-441(1993)]. A doença de Gaucher é resultante da deficiência em glucocerebrosidase (hGCD; glucosylceramidase).

[00279] Esta deficiência conduz a um acúmulo de substrato de enzima, glucocerebroside, em células reticuloendotelial da medula óssea, baço e fígado, resultando em complicações significativas para a técnica esquelética, tais como a expansão da medula óssea e a deterioração do osso, além de hiperesplenismo, hepatomegalia, trombocitopenia, anemia e complicações de pulmão [Grabowski, (1993) *ibid.*; Lee, Prog. Clin. Biol. Res. 95:177-217 (1982)].

[00280] Mais especificamente, a enzima lisossômica utilizada pelo método da invenção pode ser selecionada a partir do GCD (grupo que consiste do glucocerebrosidase), do ácido sphingomyelinase, do hexosaminidase, do α -N-acetylgalactosaminidase, do ácido lipase, do α -galactosidase, do glucocerebrosidase, do α -L-iduronidase, do iduronatosulfatase, do α -mannosidase ou do

sialidase. Preferencialmente, quando a doença tratada é a doença de Gaucher, a enzima lisossômica utilizada pelo método da invenção é o GCD.

[00281] A proteína da presente invenção pode ser utilizada para produzir uma composição farmacêutica. Dessa maneira, de acordo com um outro aspecto da presente invenção é fornecida uma composição farmacêutica que inclua, como um ingrediente ativo nestas condições, uma proteína e um portador farmacêutico aceitável. Conforme aqui utilizado, uma "composição farmacêutica" refere-se à preparação de um ou mais dos ingredientes ativos descritos acima, como uma proteína recombinante, com outros componentes químicos, como medicamentos tradicionais portadores fisiológicos adequados e excipientes. O objetivo de uma composição farmacêutica é facilitar a administração de uma proteína ou célula para o organismo. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser produzidas pelos processos bastante conhecidos na técnica, por exemplo, por meio dos processos de misturas convencionais, dissoluções, granulações, fabricação de drágeas, levigação, emulsão, encapsulamento, captura ou liofilização.

[00282] Em uma configuração preferencial, o termo "aceitável farmaceuticamente" significa que foi aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual, ou listada no U.S. Pharmacopeia ou em outra farmacopéia geralmente reconhecida para o uso em animais e, mais especificamente, em humanos. Em seguida neste documento, as frases "portador fisiológico apropriado" e "portador farmacêutico aceitável" são utilizadas de maneira alternada e referem-se a um portador aprovado ou a um diluente que não

provoque irritação significativa no organismo e que não revogue a atividade e propriedades biológicas do par administrado.

[00283] O termo "portador" refere-se a um diluente, substância, excipiente ou aparelho com que os terapêuticos são administrados. Tais portadores farmacêuticos podem ser líquidos assépticos, como água e óleos, inclusive aqueles de petróleo, animal, vegetal ou de origem sintética, como o óleo de soja, óleo de amendoim, óleo mineral, óleo do sésamo e assim por diante. A água é um portador preferencial quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. As soluções salinas e as soluções de dextrose e glicerol aquosas também podem ser empregadas como portadores líquidos, especialmente para soluções injetáveis. Os excipientes farmacêuticos apropriados contêm amido, glicose, lactose, sucrose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de silicone, o estearato de sódio, monostearate de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e assim por diante. A composição, se desejado, pode também conter quantidades menores de agentes emulsificantes ou fortificantes, ou agentes de tamponamento do pH. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, fórmulas de liberações prolongadas e assim por diante. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes e portadores tradicionais, como os triglicerídeos. A fórmula oral pode incluir portadores padrões, como a classificação farmacêutica do manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc. Os exemplos de

portadores farmacêuticos apropriados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tais composições conterão uma quantidade efetiva de forma terapêutica da proteína, preferencialmente no modo purificado, junto com uma quantidade apropriada de portador para fornecer o modelo para a administração apropriada ao paciente. A fórmula deve estar adequada para o modo de administração.

[00284] Neste documento, o termo "excipiente" refere-se a uma substância inerte incluída a uma composição farmacêutica para facilitar ainda mais os processos e administração dos ingredientes ativos.

[00285] Os exemplos, sem limitação, dos excipientes incluem o carbonato de cálcio, o fosfato de cálcio, vários açúcares e tipos de amido, derivados da celulose, gelatina, óleos vegetais e os glicóis de polietileno.

[00286] Técnicas adicionais para fórmulas e administração de ingredientes ativos podem ser encontradas em "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton. PA, última versão, que está incorporado neste documento para referência como se apresentado totalmente aqui.

[00287] As composições farmacêuticas aqui descritas podem também compreender excipientes ou portadores apropriados da fase gel ou sólida. Os exemplos destes portadores ou excipientes incluem, mas não são limitados a, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados da celulose, gelatina e polímeros como glicóis de polietileno.

[00288] As rotas de administração apropriadas podem, por exemplo, incluir a distribuição oral, retal, pela mucosa, pela epiderme, intestinal ou parenteral, inclusive injeções intramuscular, subcutâneo e intramedular, bem como injeções intratecal, intraventricular direto, intravenoso, intraperitonal, intranasal ou intraocular.

[00289] As composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente invenção podem, desta maneira, ser formuladas de maneira convencional utilizando um ou mais portadores aceitáveis farmacêuticamente abrangendo excipientes e auxiliares, que facilitem o processamento dos ingredientes ativos nas preparações que possam ser utilizados farmacêuticamente. A fórmula adequada é dependente da rota de administração escolhida.

[00290] Para a injeção, os ingredientes ativos da invenção podem ser formulados em soluções aquosas, preferencialmente em tampões fisiologicamente compatíveis, como a solução de Hank, a solução de Ringer ou o tampão salino fisiológico. Para a administração pela mucosa, os penetrantes são utilizados nas fórmulas. Geralmente, eles são conhecidos na técnica.

[00291] Para a administração oral, os ingredientes ativos podem ser opcionalmente formulados através de administração das células inteiras produzindo uma proteína de acordo com a presente invenção, como o GCD. Os ingredientes ativos também podem ser formulados combinando os ingredientes ativos e/ou as células com os portadores aceitáveis farmacêuticamente bastante conhecidos na técnica. Esses portadores permitem que os ingredientes ativos da invenção sejam formulados como comprimidos, pílulas, drágeas,

cápsulas, líquidos, gel, xaropes, pastas, suspensões e assim por diante, para que o paciente ingira oralmente. As preparações farmacológicas para o uso oral podem ser feitas utilizando um excipiente sólido, opcionalmente moendo a mistura resultante e processando a mistura dos grânulos, após ter adicionado auxiliares apropriados, se solicitado, para obter os núcleos das drágeas e comprimidos.

[00292] Os excipientes apropriados são, em particular, preenchimentos como açúcares, incluindo lactose, sucrose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanto, metil-celulose, hidroxipropil metil celulose, carboximetilcelulose sódica; e/ou polímeros fisiológicos aceitáveis, como PVP (Polivinilpirrolidona). Se desejados, os agentes desintegradores podem ser adicionados, como o Polivinilpirrolidona conectados, ágar ou ácido algínico ou um sal mencionado, como o alginato sódico.

[00293] Os núcleos das drágeas são fornecidos com revestimentos adequados. Para esta finalidade, as soluções de açúcar concentradas podem ser utilizadas, as quais podem conter opcionalmente goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, glicol de polietilene, dióxido de titânio, misturas de solventes ou solventes orgânicos adequados e soluções envernizadas. Os corantes ou pigmentos podem ser adicionados ao revestimento dos comprimidos ou das drágeas para a identificação ou caracterização de combinações diferentes de doses de ingrediente ativo.

[00294] As composições farmacêuticas, que

podem ser administradas oralmente, incluem cápsulas fáceis de engolir feitas de gelatina, além de cápsulas seladas e macias feitas de gelatina e uma massa modeladora, tal como o glicerol ou o sorbitol. As cápsulas fáceis de engolir podem conter os ingredientes ativos em uma mistura com preenchimento como lactose, aglutinantes como amido, lubrificantes como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizadores. Em cápsulas macias, os ingredientes ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos apropriados, como em óleos, parafina líquida ou glicóis de polietileno líquido. Além disso, os estabilizadores podem ser adicionados. Todas as fórmulas para a administração oral devem estar em dosagens apropriados para a rota de administração escolhida.

[00295] Para a administração oral, as composições podem tomar a forma de comprimidos ou pastilhas formuladas de maneira convencional.

[00296] Para administração por inalação, os ingredientes ativos para uso de acordo com a presente invenção são entregues em forma de spray em aerossol a partir de um pacote pressurizado ou um nebulizador com o uso de um propulsor apropriado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano ou dióxido de carbono. No caso de aerossol pressurizado, a unidade de dosagem deve ser determinada fornecendo uma válvula para conceder a quantidade medida. As cápsulas e cartuchos ou, por exemplo, gelatina para serem utilizados em um insuflador podem ser formulados contendo uma mistura de pós dos ingredientes ativos e uma base em pó adequada, como lactose ou amido.

[00297] Os ingredientes ativos descritos acima podem ser formulados para administração parenteral, por

exemplo, injeção de dose única ou infusão contínua. As fórmulas para a injeção podem ser apresentadas em dosagem única, por exemplo, em ampolas ou recipientes de várias doses com, opcionalmente, um conservante incluído. As composições podem ser em suspensão, solução ou emulsão em aparelhos aquoso ou oleoso e podem conter agentes de fórmula, como agentes de suspensão, equilíbrio e dispersão.

[00298] As composições farmacêuticas para a administração parenteral incluem soluções aquosas das preparações ativas em formas solúveis em água. Além disso, suspensões de ingredientes ativos podem ser preparados como suspensões apropriadas de injeção oleosa. Solventes lipofílicos adequados ou veículos incluem óleos gordurosos tais como óleo de gergelim ou ésteres de ácidos gordurosos sintéticos tais como oleado de etilo, triglicérides ou lipossomos. Suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como celulose de carboximetilo de sódio, sorbitol ou dextran. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores ou agentes adequados que aumentam a solubilidade dos ingredientes ativos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[00299] Numa concretização referida, a composição é formulada de acordo com procedimentos de rotina como composição farmacêutica adaptada para administração intravenosa para seres humanos. Tipicamente, composições farmacêuticas para administração intravenosa são soluções em buffer aquoso isotônico estéril. Geralmente, os ingredientes são fornecidos ou separadamente ou misturados juntos em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado ou

concentrado isento de água num recipiente hermeticamente fechado tal como uma ampola ou saché indicando a quantidade de agente ativo. Onde a composição deve ser administrada por infusão, ela pode ser dispensada com uma garrafa de infusão contendo água de nível farmacêutica estéril ou salina. Onde a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou salina pode ser fornecida a fim de que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

[00300] As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas como formas neutras ou salgadas. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles formados com aníons tais como os derivados de ácidos hidrocloreídricos, fosfóricos, acéticos, oxálicos, tartáricos, etc., e os formados com cátions tais como os derivados de sódio, potássio, amônia, cálcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol -2-etilamino, histidina, procaína, etc.

[00301] Os ingredientes ativos da presente invenção também podem ser formulados em composições retais como supositórios ou enemas de retenção, usando, por exemplo, bases de supositórios convencionais como manteiga de cacau ou outros glicérides.

[00302] As composições farmacêuticas aqui descritas também podem compreender sólido adequado de portadores ou excipientes de fase de gel. Exemplos de tais portadores ou excipientes incluem, mas não se limitam a, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, diversos açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina e polímeros como glicóis de polietileno.

[00303] A rota tópica é realizada opcionalmente e é assistida por um portador tópico. O portador tópico é um que é geralmente adequado para administração de ingrediente ativo tópico e inclui quaisquer destes materiais conhecidos na técnica. O portador tópico é selecionado de modo a fornecer a composição na forma desejada, isto é, como portador líquido ou não líquido, loção, creme, pasta, gel, pó, unguento, solvente, diluente líquido, drops e similares, e pode ser compreendido de um material de origem de ocorrência natural ou sintética. É essencial, claramente, que o portador selecionado não afete adversamente o agente ativo ou outros componentes da formulação tópica, e que é estável com relação a todos os componentes de formulação tópica. Exemplos de portadores tópicos adequados para uso incluem água, álcoois e outros solventes orgânicos não tóxicos, óleo mineral, silicone, geleia de petróleo, lanolina, ácidos gordurosos, óleos vegetais, parabenos, ceras e similares. Formulações preferidas no presente são unguentos, líquidos, loções, cremes e géis incolores e inodoros.

[00304] Unguentos são preparações semi-sólidas, que são baseadas tipicamente em petróleo ou outros derivados de petróleo. A base de unguento específica a ser usada, como será apreciado por aqueles habilitados na técnica, é um que fornecerá ótima entrega de ingredientes ativos e, preferivelmente, fornecerá outras características desejadas também, por ex., emoliência ou similares. Como com outros portadores ou veículos, uma base de unguento deve ser inerte, estável, não irritante e não sensibilizante. Como explicado em Remington: The Science and Practice of Pharmacy., 19^a Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), nas páginas 1399-

1404, bases de unguento podem ser agrupadas em quatro classes: bases oleaginosas, bases emulsificáveis, bases de emulsão e bases solúveis em água. As bases de unguento oleaginoso incluem, por exemplo, óleos vegetais, gordura obtidas de animais e hidrocarbonos semissólidos obtidos de petróleo. Bases de unguento emulsificáveis, também conhecidas como bases de unguento absorvente, contêm pouca ou nenhuma água e incluem, por exemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anidrosa e petrolato hidrofílico. Bases de unguento de emulsão são emulsões água-no-óleo (W/O) ou emulsões óleo-na-água (O/W) e incluem, por exemplo, álcool cetílico, monostearato de glicerilo, lanolina e ácido esteárico. Bases de unguento hidrossolúveis preferidas são preparadas de glicóis de polietileno de peso molecular variável; mais uma vez, pode-se fazer referência a Remington: The Science and Practice of Pharmacy para informações adicionais.

[00305] Loções são preparações a serem aplicadas à superfície da pele sem fricção, e são tipicamente preparações líquidas ou semilíquidas, nas quais as partículas sólidas, incluindo o agente ativo, estão presentes numa base de água ou álcool. Loções são normalmente suspensões de sólidos e podem compreender uma emulsão oleosa líquida do tipo óleo-na-água. Loções são formulações preferidas no presente para tratar grandes áreas do corpo, por causa da facilidade de aplicar uma composição mais fluida. É geralmente necessário que a matéria insolúvel numa loção seja finamente dividida. Loções conterão tipicamente agentes suspensos para produzir melhores dispersões, bem como ingredientes ativos úteis para localizar e manter o agente ativo em contato com a pele, isto é, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio ou similares.

[00306] Cremes contendo os ingredientes ativos selecionados são, como conhecidos na técnica, líquido viscoso ou emulsões semissólidas, ou óleo-na-água ou água-no-óleo. Bases de creme são laváveis em água e contêm uma fase de óleo, um emulsificador e uma fase aquosa. A fase de óleo, também às vezes chamada de fase "interna", é geralmente compreendida de petróleo e um álcool gorduroso tal como ácido cetílico ou estearílico; a fase aquosa, normalmente, embora não necessariamente, excede a fase de óleo em volume, e geralmente contém um humectante. O emulsificador numa formulação de creme, como explicado em Remington, supra, é geralmente um surfactante noniônico, aniônico, catiônico ou anfotérico.

[00307] Formulações de gel são preferidas para aplicação no couro cabeludo. Como será apreciado por aqueles que trabalham no campo de formulação tópica de ingredientes ativos, géis são sistemas semissólidos e do tipo suspensão. Géis de fase única contêm macromoléculas orgânicas distribuídas de modo substancial e uniforme através do líquido portador, que é tipicamente aquoso, mas também, preferivelmente, contêm um álcool e, opcionalmente, um óleo.

[00308] Diversos aditivos, conhecidos daqueles qualificados na técnica, podem ser incluídos nas formulações tópicas da invenção. Por exemplo, solventes podem ser usados para solubilizar certas substâncias de ingredientes ativos. Outros aditivos opcionais incluem intensificadores de permeação da pele, opacificadores, antioxidantes, agentes formadores de gel, agentes engrossadores, estabilizadores e similares.

[00309] As composições tópicas da presente invenção também podem ser entregues à pele usando esparadrapos

ou artigos de tipo dérmico convencional, nos quais a composição dos ingredientes ativos está contida dentro de uma estrutura laminada, que serve como dispositivo de entrega de droga a ser afixado na pele. Em tal estrutura, a composição dos ingredientes ativos é contida numa camada ou "reservatório", subjacente a uma camada traseira superior. A estrutura laminada pode conter um único reservatório, ou pode conter múltiplos reservatórios. Em uma concretização, o reservatório compreende uma matriz polimérica de material adesivo de contato farmacologicamente aceitável que serve para afixar o sistema à pele durante a entrega do ingrediente ativo. Exemplos de adequados materiais adesivos de contato com a pele incluem, mas não são limitados a, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutileno, poliacrilatos, poliuretanos e similares. O adesivo polimérico específico selecionado dependerá do ingrediente ativo específico, veículo, etc., ou seja, o adesivo deve ser compatível com todos os componentes da composição que contém o ingrediente ativo. De modo alternativo, o reservatório que contém o ingrediente ativo e o adesivo de contato com a pele estão presentes na forma de camadas separadas e distintas, com adesivo subjacente ao reservatório que, neste caso, pode ser uma matriz polimérica conforme descrito acima, pode ser um reservatório de hidrogel ou líquido, ou pode ter outra forma.

[00310] A camada de suporte desses laminados, a qual serve como superfície superior do dispositivo, funciona como o elemento estrutural primário da estrutura laminada e fornece ao dispositivo muita de sua flexibilidade. O material selecionado para o material de suporte deve ser selecionado de modo que seja substancialmente impermeável aos

ingredientes ativos e a qualquer dos componentes da composição que contém os ingredientes ativos, deste modo, impedindo a perda de quaisquer componentes através da superfície superior do dispositivo. A camada de suporte deve ser oclusiva ou não oclusiva, dependendo se é desejável que a pele torne-se hidratada durante a entrega dos ingredientes ativos. O suporte é preferivelmente feito de uma lâmina ou filme de um material preferivelmente elastomérico flexível. Exemplos de polímeros que são adequados para a camada de suporte incluem o polietileno, polipropileno e poliésteres.

[00311] Durante o armazenamento e antes do uso, a estrutura laminada inclui um revestimento de liberação. Imediatamente antes do uso, esta camada é removida do dispositivo para expor a superfície basal do mesmo, o reservatório do ingrediente ativo ou uma camada adesiva de contato separada, de modo que o sistema possa ser afixado à pele. O revestimento de liberação deve ser feito de um material impermeável de ingredientes/veículo ativo.

[00312] Tal dispositivo deve ser fabricado utilizando técnicas convencionais, conhecidas na técnica, por exemplo, por fundição de uma mistura de fluido de adesivo, ingrediente ativo e veículo na camada de suporte, seguido de laminação do revestimento de liberação. De modo similar, a mistura adesiva pode ser fundida no revestimento de liberação, seguido da laminação da camada de suporte. De modo alternativo, o reservatório de ingredientes ativos pode ser preparado na ausência do ingrediente ativo ou excipiente, e então carregado através da "infiltração" em uma mistura de ingredientes/veículo ativa.

[00313] Assim como em formulações tópicas da

invenção, a composição dos ingredientes ativos contida nos reservatórios de ingredientes ativos desses sistemas laminados deve conter diversos componentes. Em alguns casos, o ingrediente ativo deve ser entregue "nítido", ou seja, na ausência de líquido adicional. Na maioria dos casos, entretanto, os ingredientes ativos serão dissolvidos, difundidos ou suspensos em veículo adequado farmacologicamente aceitável, tipicamente um solvente ou um gel. Outros componentes, que podem estar presentes, incluem conservantes, estabilizadores, surfactantes e similares.

[00314] Deve ser observado que a proteína da invenção, tal como uma enzima lisossômica de manose elevada, é preferivelmente administrada ao paciente que necessita de uma quantidade eficaz. Conforme utilizado no presente, "quantidade eficaz" significa uma quantidade necessária para alcançar um resultado selecionado. Por exemplo, uma quantidade eficaz de composição da invenção deve ser selecionada para ser útil ao tratamento de uma doença de armazenamento lisossômica.

[00315] As composições farmacêuticas aceitáveis para uso no contexto da presente invenção incluem composições caracterizadas pelo fato de os ingredientes ativos serem contidos em uma quantidade eficaz para alcançar o propósito pretendido. Mais especificamente, uma quantidade eficazmente terapêutica significa uma quantidade de ingrediente ativo eficaz para prevenir, aliviar ou melhorar os sintomas de doenças ou prolongar a sobrevivência do paciente sob tratamento.

[00316] A determinação de uma quantidade eficazmente terapêutica é satisfatória dentro da capacidade

daqueles com habilidade na técnica, especialmente à luz da revelação detalhada fornecida no presente.

[00317] Para qualquer ingrediente ativo utilizado nos métodos da invenção, a quantidade eficaz terapeuticamente ou dose pode ser estimada inicialmente dos ensaios de atividade em animais. Por exemplo, uma dose pode ser formulada em modelos de animais para alcançar uma faixa de concentração circulante que inclui IC50 conforme determinado por ensaios de atividade.

[00318] A toxicidade e a eficácia terapêutica dos ingredientes ativos descritos no presente podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em animais experimentais por exemplo, ao determinar o IC50 e o LD50 (dose letal que causa morte em 50% dos animais testados) para um ingrediente ativo submetido. Os dados obtidos desses ensaios de atividade estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. Por exemplo, as doses eficazes terapeuticamente adequadas para tratamento de doenças genéticas podem ser determinadas a partir de experimentos com modelos de animais dessas doenças.

[00319] A dosagem pode variar dependendo da forma de dosagem empregada e a via de administração utilizada. A formulação exata, via de administração e dosagem podem ser escolhidas por cada médico dependendo da condição do paciente. (Vide, por exemplo, Fingi, et al., 1975, em "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

[00320] O intervalo e a quantidade de dosagem podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis plasmáticos da metade ativa, que são suficientes para manter

os efeitos modulatórios, denominada a concentração eficaz mínima (MEC). A MEC irá variar para cada preparação, porém pode ser opcionalmente estimada de todos os dados de animais.

[00321] Os intervalos de dosagem também podem ser determinados pela utilização do valor MEC. As preparações opcionalmente podem ser administradas utilizando um regime, o qual mantém os níveis plasmáticos acima da MEC em 10-90% do tempo, preferivelmente entre 30-90% e mais preferivelmente 50-90%.

[00322] Dependendo da gravidade e sensibilidade da condição a ser tratada, a dosagem também pode ser de uma administração única de uma composição de liberação reduzida descrita acima, com o curso de tratamento de duração de vários dias a várias semanas, ou até que seja alcançada a cura ou a diminuição do estado da doença.

[00323] Se desejado, as composições da presente invenção podem estar presentes em um dispositivo de distribuição ou envoltório, tal como um kit aprovado pela FDA, que pode conter um ou mais unidades de formas de dosagem que incluem o ingrediente ativo. O envoltório pode, por exemplo, compreender uma lâmina de plástico ou metal, tal como um envoltório de blister. O dispositivo de distribuição ou envoltório pode ser acompanhado por instruções para administração. O envoltório ou distribuidor também pode ser acompanhado por uma notificação associada ao recipiente em uma forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, utilização ou venda de produtos farmacêuticos, cuja notificação reflita a aprovação pela agência da forma das composições ou administração veterinária ou humana. Tal notificação, por exemplo, pode ser uma rotulagem aprovada pela

U.S. Food and Drug Administration para medicamentos sob prescrição ou uma bula de produto aprovado. As composições que compreendem um ingrediente ativo da invenção formuladas em um portador farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um recipiente apropriado e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

[00324] Conforme utilizado no presente, o termo "modulado" inclui a inibição, diminuição ou inversão substancialmente da progressão de uma doença, substancialmente melhorando os sintomas clínicos de uma doença ou condição, ou substancialmente impedindo o surgimento de sintomas clínicos de uma doença ou condição. Consequentemente, um "modulador" inclui um agente que pode modular uma doença ou condição.

LISTA SEQUENCIAL

NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIA: 1

Sequência de Aminoácido de ER Peptídeo de Sinal:

MKTNLFLFUFSLLLSLSSAEF

SEQ ID NO: 2

Sequência de Aminoácido do sinal de abordagem seletiva vacuolar de Tabaco Quitinase A:

DLLVDTM

SEQ ID NO: 3

Sequência do ácido nucléico do indicador Dianteiro:

Cagaattcgccccgcccctgca

SEQ ID NO: 4

Sequência de ácido nucléico do iniciador Reverso:

ctcagatcttggcgatgccaca

SEQ ID NO: 5

Sequência de ácido nucléico do acionador dianteiro do promotor

358:

ctcagaagaccagagggct

SEQ ID NO: 6

Seqüência de ácido nucléico do iniciador inverso do terminador:

Caaagcggccatcgtgc

SEQ ID NO: 7

Sequência de ácido nucléico do cDNA GCD humano utilizado para 10 construções da invenção

gccccccc	ctgcatccct	aaaagcttcg	gctacagctc	ggtggtgtgt
gtctgcaatg	ccacatactg	tgactccttt	gaccccccca	cctttcctgc
ccttggtacc	ttcagccgct	atgagagtac	acgcagtggg	cgacggatgg
agctgagtat	ggggcccatc	caggctaata	acacggggcac	aggcctgcta
ctgaccctgc	agccagaaca	gaagtccag	aaagtgaagg	gatttggagg
ggccatgaca	gatgctgctg	ctctcaacat	ccttgccctg	tcaccccctg
cccaaaattt	gctacttaaa	tcgtacttct	ctgaagaagg	aatcggatat
aacatcatcc	gggtacccat	ggccagctgt	gacttctcca	tccgcaccta
cacctatgca	gacacccctg	atgatttcca	gttgcacaac	ttcagcctcc
cagaggaaga	taccaagctc	aagatacccc	tgattcaccg	agccctgcag
ttggcccagc	gtcccgtttc	actccttgcc	agcccctgga	catcacccac
ttggctcaag	accaatggag	cggatgaatg	gaaggggtca	ctcaagggac
agcccggaga	catctaccac	cagacctggg	ccagataactt	tgtgaagtgc
ctggatgcct	atgctgagca	caagttacag	ttctgggcag	tgacagctga
aaatgagcct	tctgctgggc	tggtgagtgg	atacccttc	cagtgcctgg
gcttcacccc	tgaacatcag	cgagacttca	ttgcccgtga	cctaggtcct
accctcgcca	acagtactca	ccacaatgtc	cgctactca	tgctggatga
ccaacgcttg	ctgctgcccc	actgggcaaa	ggtggtactg	acagaccag
aagcagctaa	atatgttcat	ggcattgctg	tacattggta	cctggacttt
ctggctccag	ccaaagccac	cctaggggag	acacaccgcc	tgttcccca
caccatgctc	tttgctcag	aggcctgtgt	gggctccaag	ttctgggagc
agagtgtgcg	gctaggctcc	tgggatcgag	ggatgcagta	cagccacagc
atcatcacga	acctcctgta	ccatgtgggtc	ggctggaccg	actggaacct

```

tgccctgaac   cccgaaggag   gacccaattg   ggtgcgtaac   tttgtcgaca
gtcccatcat   tgtagacatc   accaaggaca   cgttttataa   acagcccatg
ttctaccacc   ttggccact   t   cagcaagttc   attcctgagg   gctcccagag
agtggggctg   gttgccagtc   agaagaacga   cctggacgca   gtggcactga
tgcattccga   tggctctgct   gttgtggctg   tgctaaaccg   ctctcttaag
gatgtgcctc   ttaccatcaa   ggatcctgct   gtgggcttcc   tggagacaat
ctcacctggc   tactccattc   acacctacct   gtggcatcgc   cag

```

SEQ ID NO: 8

Sequência de aminoácido de Glicocerebrosidase

```

A R P C I P K S F G Y S S V V
C V C N A T Y C D S F D P P T F P A L G T F S
R Y E S T R S G R R M E L S M G P I Q A N H T
G T G L L L T L Q P E Q K F Q K V K G F G G A
M T D A A A L N I L A L S P P A Q N L L L K S
Y F S E E G V R L L M L N D Q R L L L P H W A K V V L T D E
E A A K Y V H G I A V H W Y L D F L A P A K A T L G E T H F
L F P N T M L F A S E A C V G 8 K F W E Q S V R L G S W D R G
M Q Y S H S I I T N L L Y H V V G W T D W N L A L N P E G G
P N W V R N F V D S P I I V D I T K D T F Y K Q P M F Y H L
G H F S K F I P E G S Q R V G L V A S Q K N D L D A V A L M
H P D G S A V V V V L N R S S K D V P L T I K D P A V G F L
E T I S P G Y S I H T Y L W H R Q

```

SEQ ID NO: 9

Sequência de ácido nucléico promotor ³⁵S

```

Ttttcacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggttccattgcccagctatctgtcac
ttcatcgaaaggacagtagaaaaggaaggtggctcctacaaatgcatcattgcgataaa
ggaaaggctatcgttcaagatgcctctaccgacagtggtcccaaagatggacccccaccc
acgaggaacatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattga
tgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccctt
cctctatataaggaagttcatttcatcttgagaggac

```

SEQ ID NO: 10

Sequência de ácido nucléico que codifica o peptídeo de sinal
ER

atgaagactaatctttttctcttttctcatcttttcacttctc
ctatcattateetcggccgaattc

SEQ ID NO: 11

Sequência de ácido nucléico que codifica a sequência de
abordagem seletiva vacuolar gatcttttagtcgatactatg

SEQ ID NO: 12

Sequência de ácido nucléico do terminador

taatttcatgatctgttttgttgattcccttgcaatgcagggcctagggctatgaAtaa
agttaatgtgtgaatgtgtgaatgtgtgattgtgacctgaagggatcacgactataatcg
tttataataaacaagactttgtcccaaaaacccccccccngcaga

SEQ m NO: 13

Sequência de ácido nucléico do cassete de expressão da
invenção

ttttcacaaagggtaatatcgggaaacctcctcggattccattgcccagctatctgtcac
ttcatcgaaaggacagtagaaaaggaaggtggctcctacaaatgccatcattgcgataaa
ggaaaggctatcgttcaagatgcctctaccgacagtggtcccaaagatggacccccaccc
acgaggaacatcgtggaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattga
tgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagaccct
tcctctatataaggaagttcatttcatttggagaggacaggcttcttgagatccttcaac
aattaccaacaacaacaacaacaacattacaattactatttacaattacagtcga
gggatccaaggagatataacaatgaagactaatctttttctcttttctcatcttttcactt
ctcctatcattatcctcggccgaattcgcccgcccctgcatccctaaaagcttcggctac
agctcgggtggtgtgtgtctgcaatgccacatactgtgactcctttgacccccgaccttt
cctgcccttggtaccttcagccgctatgagagtacacgcagtgggcgacggatggagctg
agtatggggcccatccaggctaatacacagggcacaggcctgctactgacctgcagcca
gaacagaagttccagaaagtgaagggtttggaggggcatgacagatgctgctgctctc
aacatccttgccctgtcacccccctgcccaaaatttgctacrtaaatcgTacttctctgaa
gaaggaatcgggatataacatcatccgggtacccatggccagctgtgacttctccatccgc

acctacacctatgcagacacccctgatgatttccagttgcacaacttcagcctcccagag
gaagataccaagctcaagatacccctgattcaccgagccctgcagttggcccagcgtccc
gtttcactccttgccagcccctggacatcacccacttgggtcaagaccaatggagcgggtg
aatgggaaggggtcactcaagggacagcccggagacatctaccaccagacctggggcaga
tactttgtgaagttcctggatgcctatgctgagcacaagttacagttctgggcagtgaca
gctgaaaatgagccttctgctgggctgttgagtggataccccttCCagtgctgggcttc
accctgaacatcagcgagacttcattgcccgtgacctaggtcctacctcgccaacagt
actcaccacaatgtccgcctactcatgctggatgaccaacgcttgctgctgccccactgg
gcaaagggtggtactgacagacccagaagcagctaaatatgttcatggcattgctgtacat
tggtacctggactttctgggtccagccaaagccaccctaggggagacacaccgcctgttc
cccaacaccatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagttctgggagcagagt
gtgcggttaggtcctgggatcgagggatgcagtacagccacagcatcatcacgaacctc
ctgtacctatgtggtcggtggaccgactggaaccttgccctgaaccccgaaggaggaccc
aattgggtgcgtaactttgtcgacagtcccatcattgtagacatcaccaaggacacgttt
taciaaacagcccatgttctaccaccttgccacttcagcaagttcattcctgagggctcc
cagagagtggggctgggttgccagtcagaagaacgacctggacgcagtggcactgatgcat
cccgatggctctgctgttggtcggtcgtaaacgcctcttaaggatgtgcctcttace
atcaaggatcctgctgtgggcttctggagacaatctcacctggctactccattcacacc
tacetgtggcatcgccaagatcttttagtcgatactatgtaattteatgatctgttttgt
tgtattcccttgcaatgcagggcctagggctatgaAtaaagttaatgtgtgaatgtgtga
atgtgtgattgtgacctgaagggatcacgactataatcgttttataataaacaagacttt
gtcccaaaaacccccccccnngcaga

SEQ ID NO: 14

Sequência de ácido nucléico da proteína recombinante da invenção

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

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

Outras Configurações

[00325] Deve ser entendido que enquanto a invenção foi descrita em conexão com a descrição detalhada do presente, a descrição precedente, por sua vez, tem a intenção de ilustrar e não de limitar o escopo da invenção, a qual é definida pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e alterações estão dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REFERÊNCIAS

1. Ma, J. K. C., Drake, P.M.W., and Christou, P. (2003) *Nature reviews*, 4, 794-805
2. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M, Rayon, C, Fischette-Laine, A.C., Gomord, V, Faye, L. (1998) *Plant Mol Biol* 38, 31-48.
3. Lee, R. E. (1982) *Prog Clin Biol Res* 95, 177-217.
4. Grabowski, G. (1993) *Adv Hum Genet.* 21, 377-441.
5. Grabowski, G. A., and Hopkin, R. J. (2003) *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 4, 403-436.

6. Sorge, J. W. , C., Westwood, B., Beutler, E. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA*. 82, 7289-7293.
7. Berg-Fussman, A., Grace, M. , Ioannou, Y., and Grabowski, G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14861-14866.
8. Grace, M. Grabowski, GA. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 168, 771-777.
9. Grace, M. , Newman, K. , Scheinker, V. , Berg-Fussman, A., and Grabowski, G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2283-2291.
10. Barton, N. W., Brady,. R.O., Dambrosia, J.M. , Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., et al. (1991) *N Engl J Med*. 324, 1464-1470.
11. Grabowski, G. A., Barton, N. W. , Pastores, G., Dambrosia, J. M. , Banerjee, T. K. , McKee, M. A., Parker, C., Schiffmann, R. , Hill, S. C., and Brady, R. O. (1995) *Ann Intern Med* 122, 33-39.
12. Pastores, G. M. , Sibille, A.R., Grabowski, G.A. (1993) *Blood* 82, 408-416.
13. Weinreb, N. J., Charrow, J, Andersson, H.C., Kaplan, P, Kolodny, E.H., Mistry, P, Pastores, G, Rosenbloom, B.E., Scott, C.R., Wappner, R.S., Zimran, A. (2002) *Am J Med* 113, 112-119.
14. Bijsterbosch, M. K. , Donker, W, van de Bilt, H, van Weely, S, van Berkel, T.J., Aerts, JM. (1996) *Eur J Biochem* 237, 344-349.
15. Friedman, B., Vaddi, K., Preston, C., Mahon, E., Cataldo. J. R. , and McPherson, J. M. (1999) *Blood* 93, 2807-2816 .
16. Furbish, F. S., Steer, C.J., Krett, N.L., Barranger, J.A. (1981) *Biochim Biophys Acta* 673, 425-434.
17. oebber, T., Wu, M., Bugianesi, R. , Ponpipom, M.,

- Furbish, F., Barranger, J., Brady, R. , and Shen, T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2193-2199.
18. Dwek, R. A., Butters, T.D., Platt, F.M., Zitzmann, N. (2002) *Nature reviews* 1, 65-75.
19. Neuhaus, J. M. , Rogers, J.C. (1998) *Plant Mol Biol* 38, 127-144.
20. itale, A., Galili, G. (2001) *Plant Physiol.* 125, 115-118
21. Hellens, R., Edwards, EA. , Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux P.M. (2000) *Plant Mol Biol* 42, 819-832.
22. Wurtele, E. S., Bulka, K. (1989) *Plant Sci* 61, 253-262.
23. den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P.J. (1995) *Methods Mol Biol.* 55, 63-72.
24. Laemmli, U. K. (1970) *Nature reviews* 221, 680-685.
25. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* 72, 248-254.
26. Stahl, P. G. S. (1982) *J Cell Biol* 93, 49-56.
27. Takasaki, S., Murray, G., Furbish, F., Brady, R. , Barranger, J., and Kobata, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10112-10117.
28. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M. Rayon, C., Fitchette-Laine, A. C., Gomord, V., and Faye, L. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38, 31-48.
29. Frigerio, L., Pastres, A., Prada, A., and Vitale, A. (2001) *Plant Cell* 13, 1109-1126
30. Frigerio, L., de Virgilio, M., Prada, A., Faoro, F., and Vitale, A. (1998) *Plant Cell* 10, 1031-1042
31. Hadlington JL, D. J. (2000) *Curr Opin Plant Biol.* 3, 461-468
32. Okamoto, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Minamikawa, T. (2003) *Plant Physiol.* 132, 1892-1900
33. Bardor, M. , Faveeuw, C., Fitchette, A.-C., Gilbert, D.,

Galas, L., Trottein, F., Faye, L., and Lerouge, P. (2003)
Glycobiology 13, 427-434.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de proteína de fusão GCD humana de SEQ ID NO 14, codificada pelo ácido nucleico da SEQ ID NO 13, compreendendo uma proteína glucocerebrosidase humana (hGCD) de SEQ ID NO 8 ligada, em seu terminal N, ao sinal de direcionamento para retículo endoplasmático de SEQ ID NO 1 e, em seu C-terminal, ao sinal de direcionamento para vacúolo de SEQ ID NO 2, em que a referida proteína GCD humana é glicosilada e compreende pelo menos um resíduo de manose exposto, pelo menos um resíduo de fucose possuindo uma ligação glicosídica alfa (1-3) e pelo menos um resíduo de xilose, **caracterizado por** ser para preparar um medicamento para o tratamento da doença de Gaucher.

2. Composição farmacêutica, **caracterizado por** compreender, como ingrediente ativo, uma proteína de fusão GCD humana de SEQ ID NO 14, codificada pelo ácido nucleico de SEQ ID NO 13, compreendendo uma proteína glucocerebrosidase humana (hGCD) de SEQ ID NO 8 ligada, em seu terminal N, ao sinal de direcionamento para retículo endoplasmático de SEQ ID NO 1 e, em seu C-terminal, ao sinal de direcionamento para vacúolo de SEQ ID NO 2, em que a referida proteína GCD humana é glicosilada e compreende pelo menos um resíduo de manose exposto, pelo menos um resíduo de fucose possuindo uma ligação glicosídica alfa (1-3) e pelo menos um resíduo de xylose, em que a referida composição farmacêutica compreende ainda um veículo farmaceuticamente aceitável.

P10410520

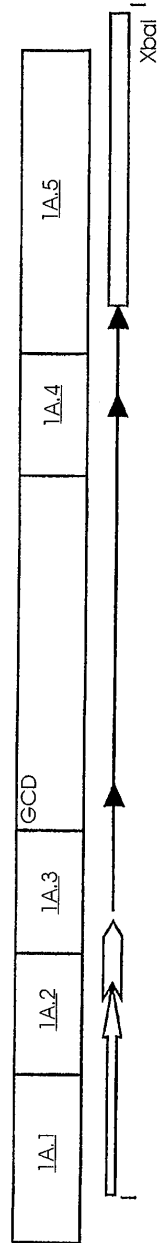


FIG. 1a

P10410520

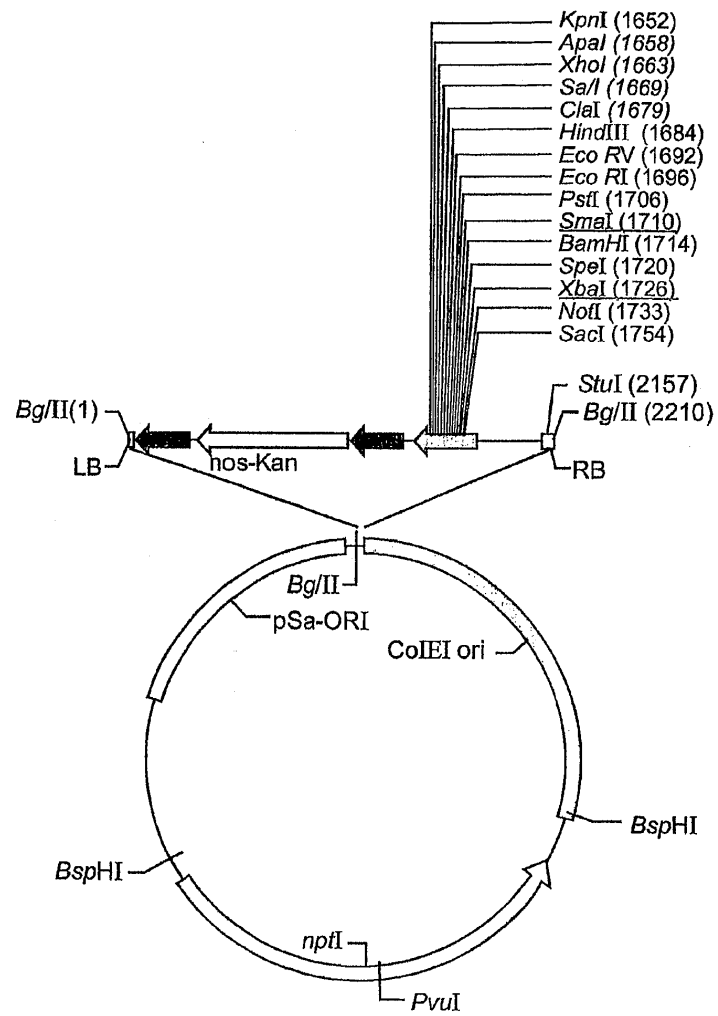


FIG. 1b

P10410520

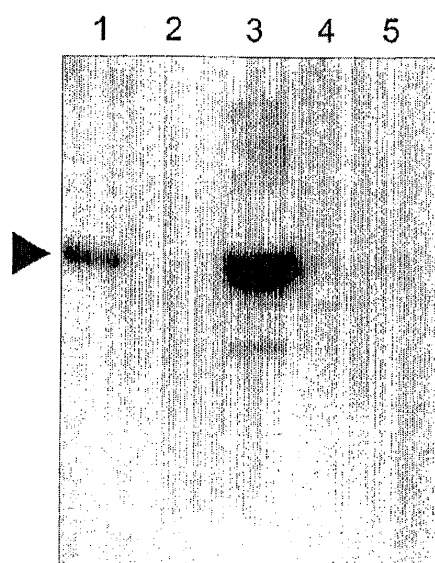


FIG.2

P10410520

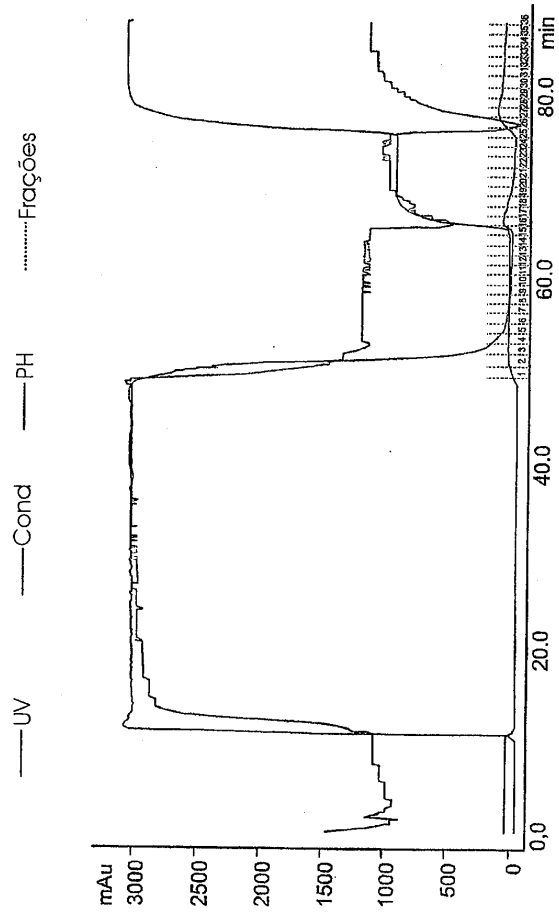


FIG.3a

P10410520

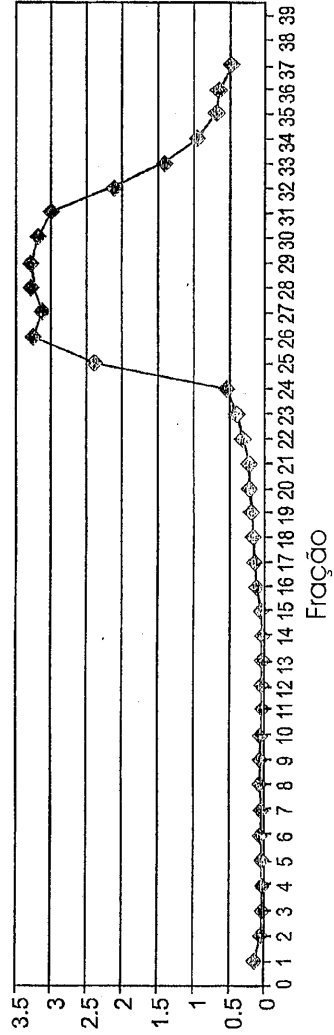


FIG.3b

FT 1 3 5 8 12 15 16 17 19 23 25 26 27 29 33 MW

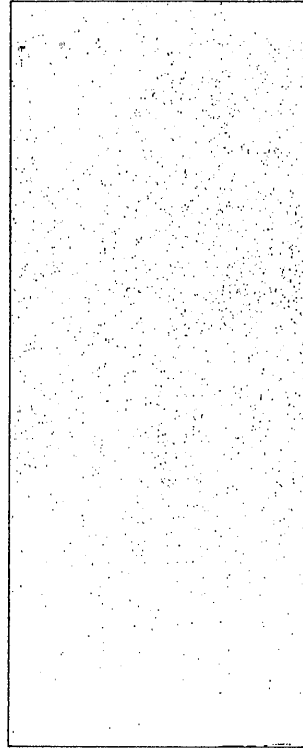


FIG.3c

P10400520

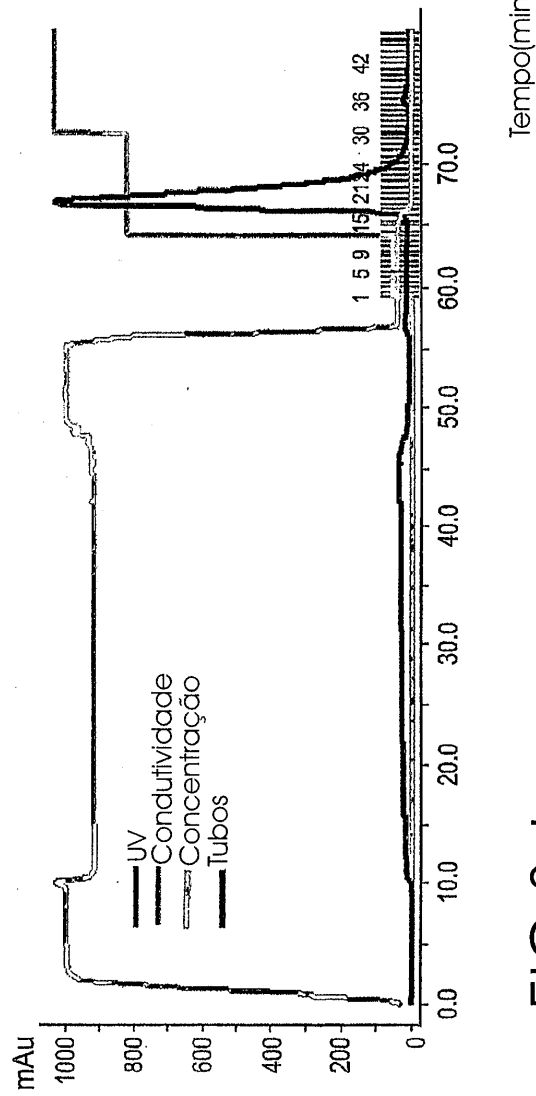


FIG.3d

P10410520

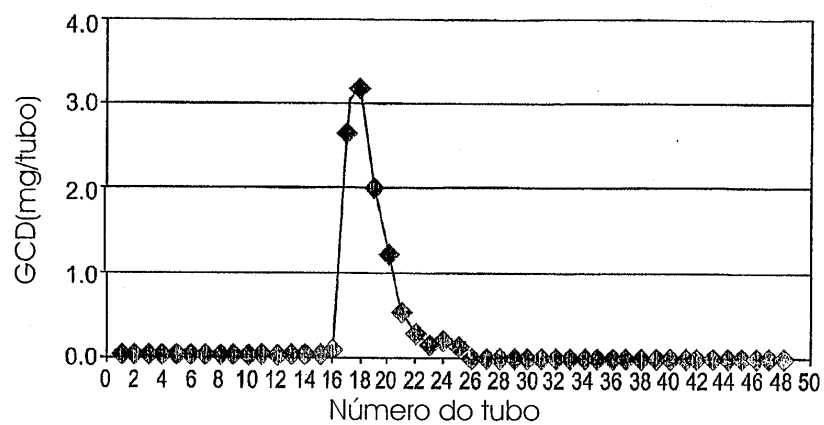


FIG.3e

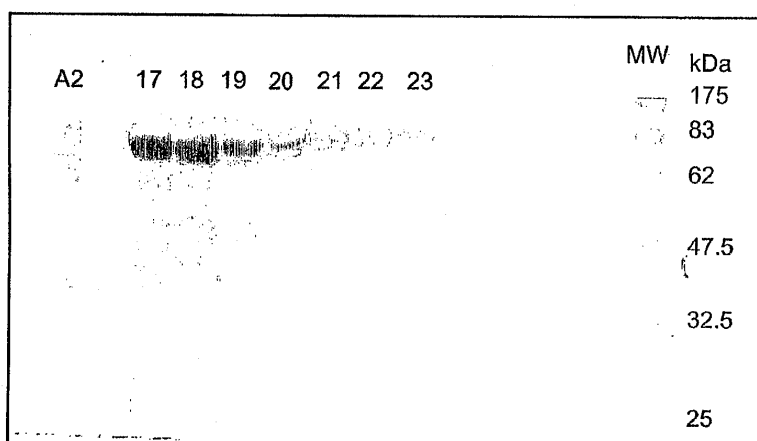


FIG.3f

P10410520

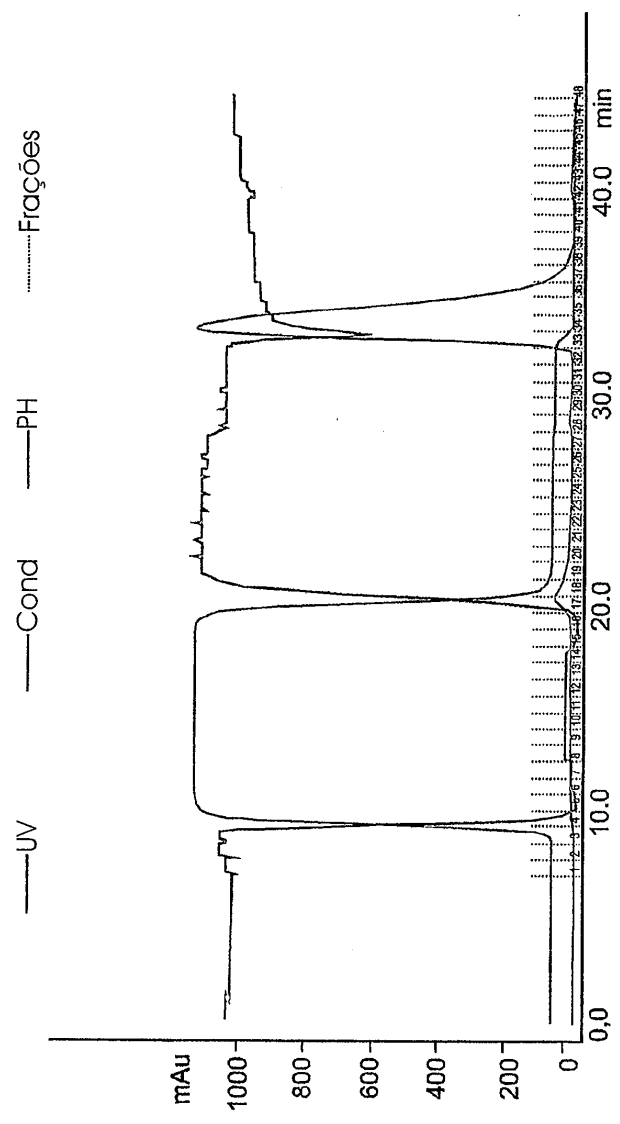


FIG.4a

P10410520

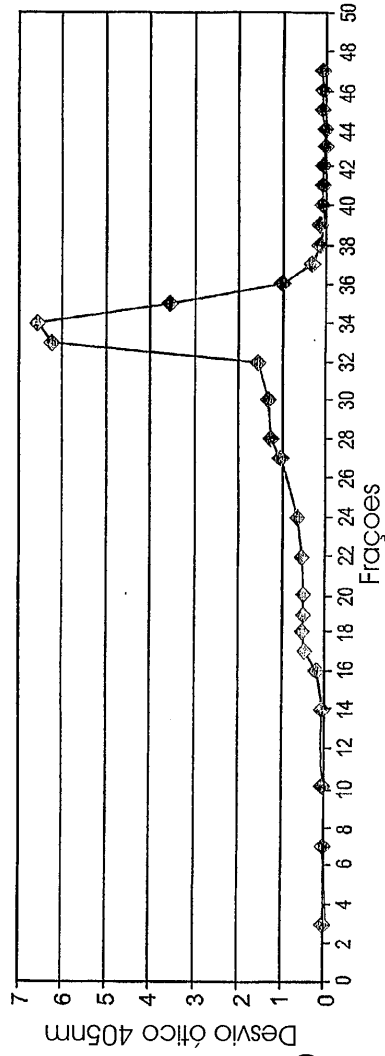


FIG.4b

17 18 20 24 27 28 30 32 33 34 35 36 37 40 Load MW

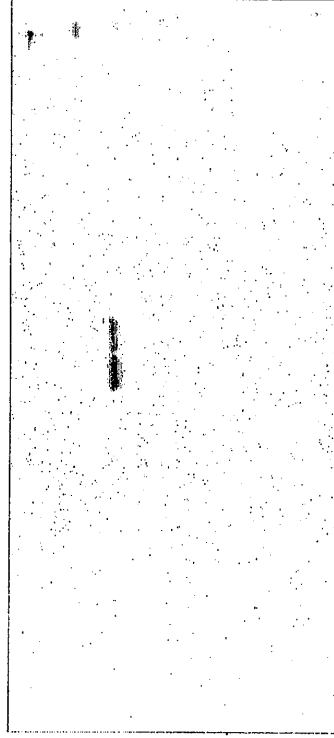


FIG.4c

P10410520

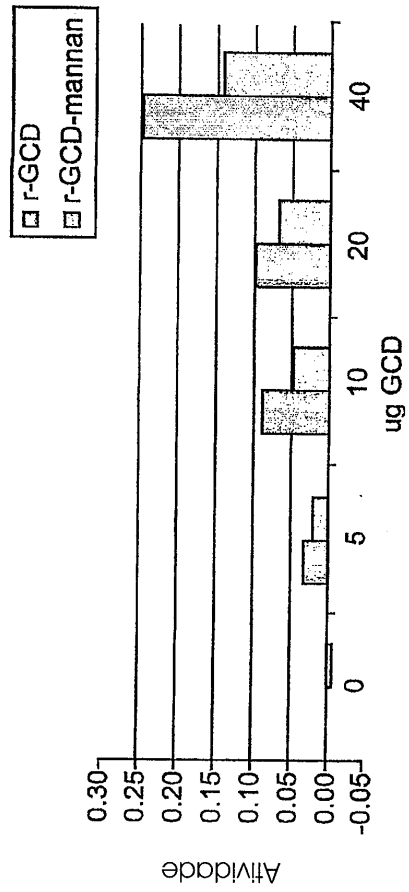


FIG.5a

P1040500

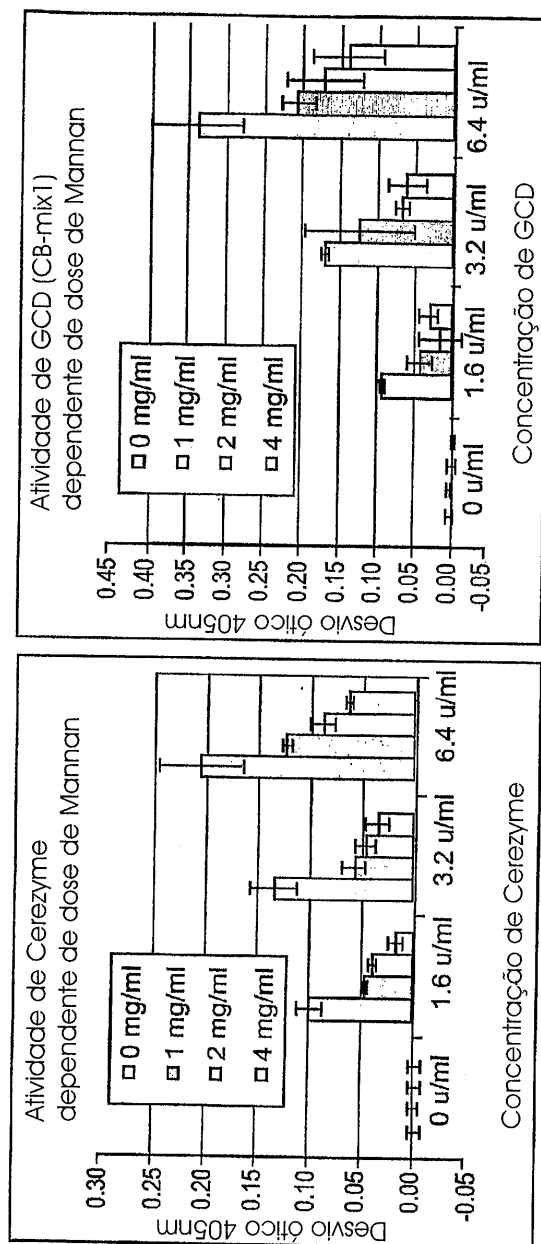


FIG. 5b

110410500

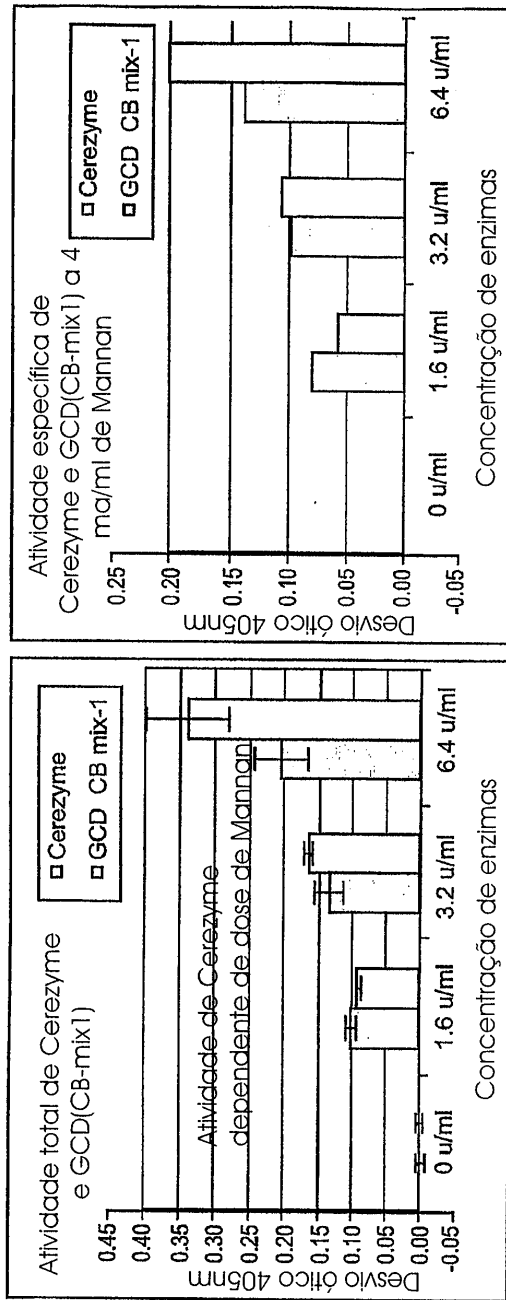


FIG.5c

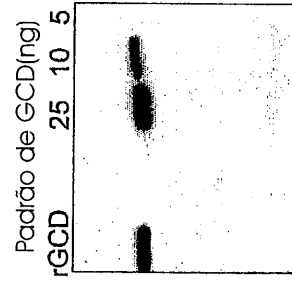


FIG.5d

P10410520

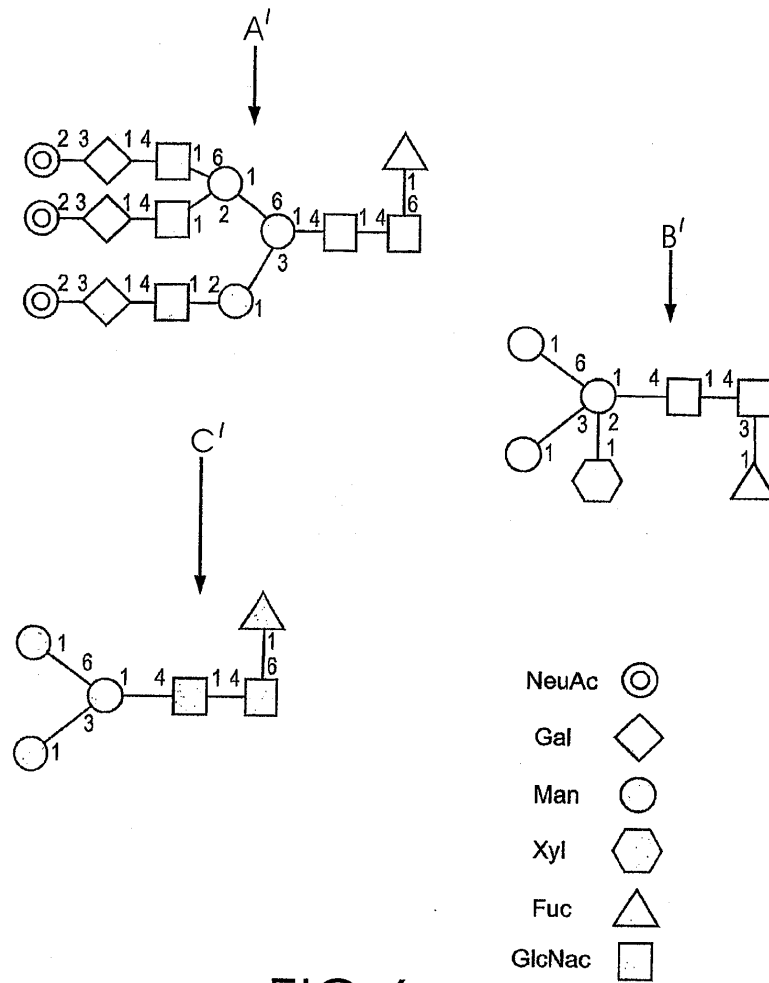


FIG. 6

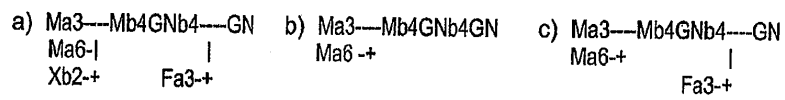


FIG. 7

P10410520

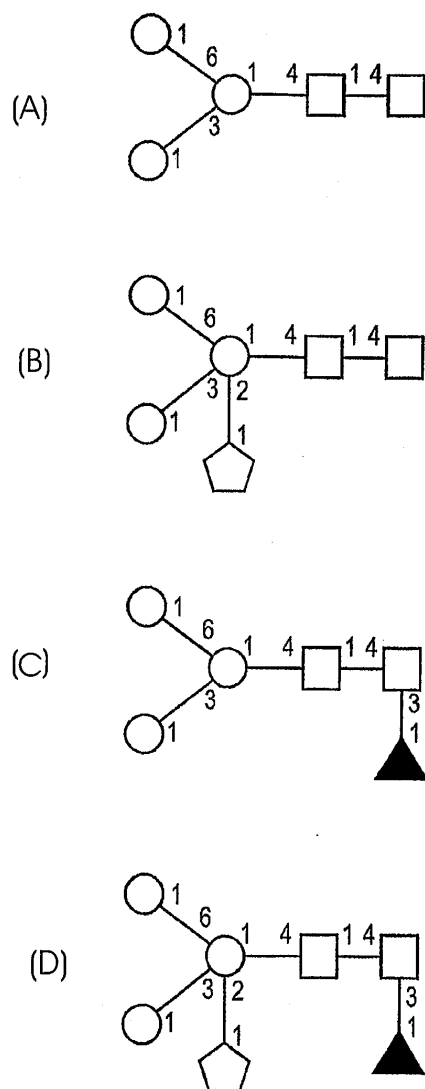


FIG.8a

P10410520

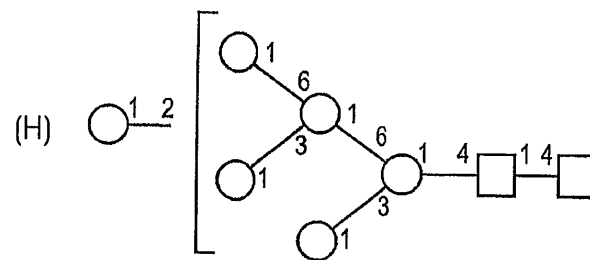
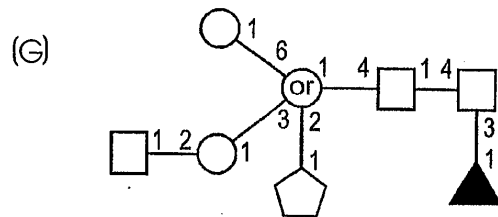
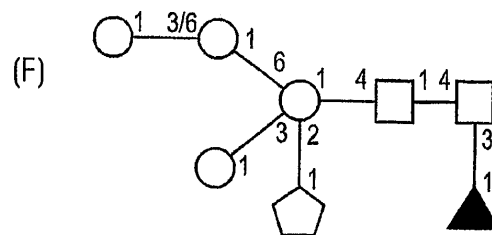
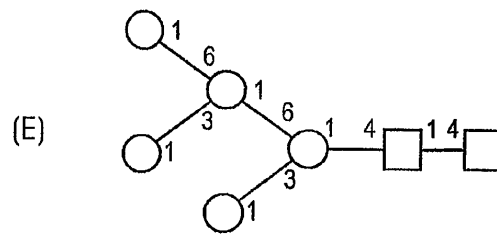


FIG.8b

P10410520

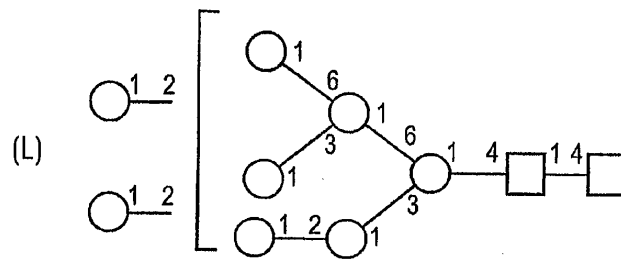
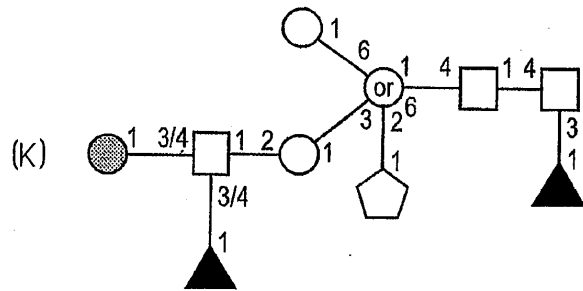
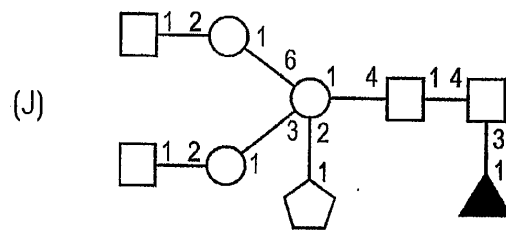
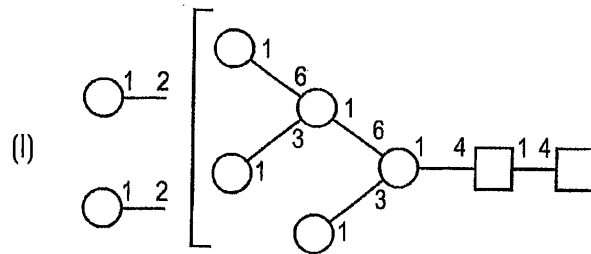


FIG. 8c

P10410520

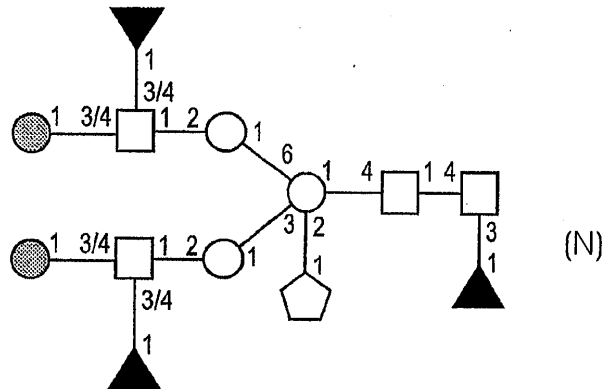
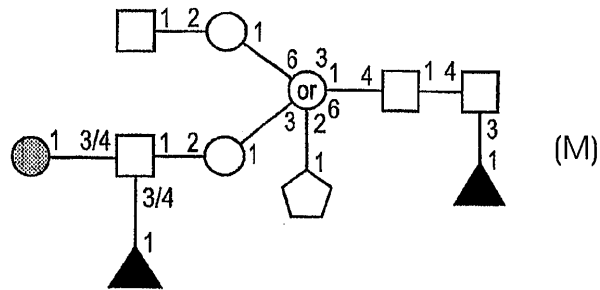


FIG.8d

