

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 734**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2017** **PCT/US2017/054755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2018** **WO18064667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2017** **E 17857616 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3519568**

54 Título: **Composiciones que comprenden una GlcNAc-1-fosfotransferasa modificada y procedimientos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

30.09.2016 US 201662402468 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2024

73 Titular/es:

WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)
One Brookings Drive
Saint Louis, MO 63130, US

72 Inventor/es:

KORNFELD, STUART;
LIU, LIN;
LEE, WANG y
DORAY, BALRAJ

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 983 734 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden una GlcNAc-1-fosfotransferasa modificada y procedimientos de uso de las mismas

Derechos gubernamentales

- 5 Esta invención fue realizada con apoyo gubernamental según CA 008759 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH). El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

- 10 La divulgación proporciona una enzima UDP-GlcNAc:lisosomal GlcNAc-1-fosfotransferasa modificada, como se establece en las reivindicaciones adjuntas, con capacidad mejorada para fosforilar enzimas lisosomales y procedimientos de uso de la misma.

Antecedentes de la invención

- 15 La Terapia de Sustitución Enzimática (ERT) es actualmente la principal forma de tratamiento para una serie de enfermedades de almacenamiento lisosómico, aunque su eficacia varía entre los trastornos individuales. La mayoría de estos trastornos hereditarios surgen de la falta de actividad de una sola enzima lisosomal que conduce a la acumulación del material normalmente degradado por la enzima. La acumulación del material de almacenamiento en el lisosoma acaba provocando la disfunción de células y órganos. El objetivo de la ERT es introducir cantidades suficientes de enzima normal en los lisosomas de las células defectuosas para eliminar el material de almacenamiento y restaurar la función del lisosoma. Esta forma de terapia se utilizó por primera vez en pacientes con enfermedad de Gaucher de tipo 1 que carecen de actividad β -glucocerebrosidasa ácida y acumulan glucosilceramida principalmente en células de tipo macrófago. La enzima de sustitución, que contiene glicanos N-ligados con residuos terminales de manosa, se infunde por vía intravenosa y es captada por los macrófagos a través de los receptores de manosa de la superficie celular. A continuación, la enzima endocitada es transportada a través de los endosomas a los lisosomas, donde funciona con buenos resultados clínicos en este trastorno.
- 25 Dado que la mayoría de los tipos celulares carecen de receptores de manosa, las enzimas de sustitución utilizadas para tratar los trastornos de almacenamiento lisosómico que afectan a tipos celulares distintos de los macrófagos utilizan la unión a receptores de manosa 6-fosfato (Man-6-P) en la superficie celular para su posterior transporte a los lisosomas. Estas enzimas se purifican a partir de las secreciones de células de mamíferos, principalmente células de ovario de hámster chino, diseñadas para producir altos niveles de la enzima de interés. Este enfoque depende de la capacidad de la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena para fosforilar los residuos de manosa de los N-glicanos de la enzima lisosomal expresada. Algunas de las enzimas de sustitución producidas por esta técnica están altamente fosforiladas y se unen bien a los receptores Man-6-P. Otras, sin embargo, están poco fosforiladas, lo que limita su eficacia en la ERT. Esto incluye la enzima de la enfermedad de Pompe (α -glucosidasa ácida, GAA) y la enzima de la alfa-manosidosis (α -manosidasa ácida lisosomal, LAMAN).
- 30
- 35

Por lo tanto, en la técnica existe una necesidad de procedimientos mejorados de terapia de sustitución enzimática y de producción enzimática mejorada.

- 40 Van Meel *et al.*: «Multiple Domains of GlcNAc-1-phosphotransferase Mediate Recognition of Lysosomal Enzymes», J. BIOL CHEM, vol. 291, no. 15, 8 de abril de 2016 (2016-04-08), páginas 8295-8307) divulgan una subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa modificada con una delección interna de aminoácidos.

Resumen de la invención

- 45 La invención es tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la divulgación proporciona una subunidad GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT) α/β modificada que comprende la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT humana de longitud completa con dos delecciones internas del aminoácido 86 a 322 y del aminoácido 438 a 928 de la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT humana de longitud completa que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, donde la subunidad GlcNAc-1-PT α/β humana de longitud completa tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1.

- 50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector que comprende el polinucleótido de una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT modificada, en el que se elimina el espaciador-1, o espaciador-1 y la región entre el sitio de escisión de Notch-1 y la subunidad α/β .

En un aspecto, la divulgación proporciona una célula huésped que incluye un vector que comprende el polinucleótido de una subunidad α/β GlcNAc-1-PT modificada, en la que se suprimen el espaciador-1, o espaciador-1 y la región entre el sitio de escisión de la subunidad Notch-1 y α/β .

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la fosforilación de oligosacáridos de una proteína de interés, tal como β -glucocerebrosidasa (GBA), GalA, Cathepsina D (CathD), enfermedad de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2), β -hexosaminidasa (HEXB), α -galactosidasa (GLA), β -manosidasa (MANBA), alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, α -glucosidasa ácida (GAA), o α -manosidasa ácida lisosomal (LAMMAN), mediante la expresión de una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT exógena en una célula.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la unión de una proteína de interés a receptores de manosa 6-fosfato (Man-6-P) de la superficie celular, expresando una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT modificada en una célula.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para mejorar la fosforilación de enzimas lisosomales, mediante la coexpresión de una GlcNAc-1-PT α/β modificada con una enzima lisosomal de interés tal como GBA, GalA, CathD, NPC2, HEXB, GLA, MANBA, alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, GAA, o LAMMAN en una célula.

Breve descripción de las figuras

El expediente de la solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color previa petición y pago de la tasa necesaria.

Las FIG. 1A, FIG. 1B, FIG. 1C, FIG. 1D, FIG. 1E, FIG. 1F y FIG. 1G representan un esquema, alineación, inmunoblots o inmunotransferencia y gráficos que muestran que el dominio espaciador-1 regula el sitio de escisión del precursor α/β . (FIG. 1A) Esquema de la disposición modular de la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT y sustitución de la secuencia espaciador-1 humana por espaciador-1 de *D. discoideum*. (FIG. 1B) Análisis de inmunotransferencia de α/β WT frente al mutante de delección DS1 expresado en células HeLa *GNPTAB*^{-/-} sondeadas con anticuerpo anti-V5. (FIG. 1C) Actividad fosfotransferasa hacia el azúcar simple α MM, utilizando extractos de células *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con vector, precursor WT α/β o los distintos ADNc mutantes. La actividad se normalizó con respecto a la concentración total de proteínas. (FIG. 1D) Inhibición de la actividad S1P de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con el precursor α/β WT o el ADNc mutante DS1. 24 h después de la transfección, se añadió PF-429242 a las células a una concentración final de 10 μ M y se incubaron las células durante otras 24 h antes de cosecharlas. Se prepararon extractos celulares y 20 μ g de cada lisado se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a western blotting. (FIG. 1E) Alineación de aminoácidos de los dos sitios de sustrato S1P de la subunidad GlcNAc-1-PT α con otros sitios S1P conocidos. El recuadro sombreado muestra el motivo de escisión consensuado conservado. (FIG. 1F) Análisis de inmunoblot (inmunotransferencia) de los mutantes puntuales, R925A, R879A y R925A/R879A en el contexto de WT α/β o del mutante de delección DS1. Las proteínas expresadas en células HeLa *GNPTAB*^{-/-} se separaron mediante gel SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo anti-V5. (FIG. 1G) Transfección de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} con WT α/β o los diversos mutantes mostrados en la FIG. 1F para determinar la fosforilación enzimática determinada por la unión de tres enzimas lisosomales endógenas a perlas de afinidad CI-MPR. Se ensayó la actividad del material unido y los valores obtenidos con células transfectadas con WT α/β se fijan en 100%.

Las FIG. 2A, FIG. 2B y FIG. 2C muestran gráficos e inmunotransferencia que demuestran que la delección del espaciador-1 aumenta la fosforilación de varias glicoproteínas no lisosomales. (FIG. 2A) La fosforilación en manosa del total de proteínas solubles se determinó transfectando células HeLa *GNPTAB*^{-/-} con el vector solo, el precursor WT α/β o el ADNc mutante DS1, seguido del marcaje con [2-³H]manosa. Los valores mostrados se calculan como el porcentaje de recuentos recuperados con las perlas de afinidad CI-MPR como fracción de los recuentos totales en el precipitado de ácido fosfotúngstico. * representa $p < 0.05$. (FIG. 2B) Las células HeLa *GNPTAB*^{-/-} fueron co-transfectadas con plásmidos que codificaban las 3 proteínas lisosomales o las 4 proteínas no lisosomales junto con el precursor WT α/β o el ADNc mutante DS1. Las células se marcaron con [2-³H]-manosa, seguido de inmunoprecipitación de las proteínas secretadas al medio y determinación del porcentaje de N-glicanos que contenían Man-6-P. Los valores obtenidos con WT se ajustan a 1.0. Los valores absolutos de fosforilación para las proteínas indicadas coexpresadas con precursor WT α/β fueron: GLA, 36 $\pm$ 3%; NPC2, 51 $\pm$ 6%; CathD 25 $\pm$ 8%; DNasa I, 23 $\pm$ 4%; Renina, 21 $\pm$ 4%; LIF, 24 $\pm$ 7%; PoFut2, 12,6%. (FIG. 2C) Western blot de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} co-transfectadas con los plásmidos de expresión de las proteínas indicadas junto con el vector vacío, el precursor WT α/β o el ADNc mutante DS1. Los lisados celulares se incubaron con perlas de afinidad CI-MPR y la unión de las diversas proteínas se determinó sondeando el blot (o membrana) con los siguientes anticuerpos: Renina - anti-HA; NPC2, GP, Lamp1 y Lamp2 con anticuerpos generados contra la proteína nativa.

Las FIG. 3A, FIG. 3B, FIG. 3C, FIG. 3D, FIG. 3E, FIG. 3F y FIG. 3G representan un esquema, gráficos e inmunotransferencias que muestran la generación de una enzima mínima capaz de fosforilar muchas glicoproteínas de forma no específica. (FIG. 3A) Esquema de los diversos constructos de delección del precursor α/β expresadas en células HeLa *GNPTAB*^{-/-}. (FIG. 3B) La fosforilación en manosa del total de proteínas solubles se determinó transfectando células HeLa *GNPTAB*^{-/-} con el precursor α/β WT o los ADNc mutantes de delección indicados, seguido del marcaje con [2-³H]manosa. Los valores mostrados se calculan como el porcentaje de recuentos recuperados con las perlas de afinidad CI-MPR como fracción de los recuentos totales en el

precipitado de ácido fosfotúngstico. Se restó el valor de fondo de $0.8 \pm 0.3\%$ para obtener los valores finales representados. * representa $p < 0.05$ y ** representa $p < 0.01$. (FIG. 3C) Transfección de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} con el precursor α/β WT, el cADN mutante de delección N1-D o S1-D. El grado de fosforilación mediada por WT o proteínas mutantes se determinó mediante la unión de tres enzimas lisosomales endógenas a perlas de afinidad CI-MPR. Se ensayó la actividad del material unido y los valores obtenidos con células transfectadas con WT α/β se fijan en el 100%. (FIG. 3D) Western blot del precursor WT α/β y los mutantes de delección expresados en células HeLa *GNPTAB*^{-/-}. Se cargó la cantidad indicada de cada extracto celular y se detectaron el precursor α/β y las subunidades β con un anticuerpo anti-V5. (FIG. 3E) Actividad catalítica del precursor α/β WT y de los mutantes hacia α MM utilizando cantidades iguales de extractos celulares enteros. El extracto celular *GNPTAB*^{-/-} HeLa transfectado solo con vector sirvió de control y el valor WT se fijó en el 100% tras restar el fondo solo con vector. (FIG. 3F) Análisis de inmunotransferencia de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} co-transfectadas con los plásmidos de expresión de las proteínas indicadas junto con el vector vacío, el precursor WT α/β o los ADNc mutantes de delección indicados. Los lisados celulares se incubaron con perlas de afinidad CI-MPR y la unión de las distintas proteínas se determinó sondeando los blots con los anticuerpos descritos en la FIG. 2C, o con anti-myc para PoFut2 y etiqueta anti-Strep para los dominios A1A2A3 de vWF. (FIG. 3G) Transfección de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} con el precursor α/β WT, los ADNc mutantes de delección N1-S3 o S1-S3. El grado de fosforilación mediada por proteínas WT o mutantes se determinó mediante la unión de tres enzimas lisosomales endógenas a perlas de afinidad CI-MPR. Se ensayó la actividad del material unido y los valores obtenidos con células transfectadas con WT α/β se fijan en 100%.

La FIG. 4 representa un gráfico que muestra que la fosforilación de glicoproteínas no lisosomales está mediada por el precursor α/β mínimo. Las células HeLa *GNPTAB*^{-/-} fueron co-transfectadas con el precursor α/β WT o con el ADNc mutante de delección S1-S3, junto con plásmidos de expresión para las 4 glicoproteínas no lisosomales. 48 h post-transfección, las células se marcaron durante 2 h con [2-³H]-manosa, seguido de inmunoprecipitación de las proteínas secretadas al medio y determinación del porcentaje de N-glicanos que contenían Man-6-P. Los valores obtenidos con WT se fijan en 1. Los valores absolutos de fosforilación para las proteínas indicadas coexpresadas con precursor α/β WT fueron: LIF, $26 \pm 5\%$; Renina, $22 \pm 2\%$; PoFut2, $26 \pm 2\%$, DNasa I, $22 \pm 3\%$.

La FIG. 5 muestra un modelo de la función de GlcNAc-1-PT. (Arriba) La GlcNAc-1-PT, en estado basal, es incapaz de engancharse a las cadenas de glicanos de las moléculas sustrato, ya que el dominio espaciador-1 (púrpura) interfiere con el sitio catalítico formado por los cuatro dominios Stealth (rosa). La unión del sitio de acoplamiento de la proteína de la enzima lisosomal con el dominio de interacción de los módulos Notch/DMPAP (naranja) induce un cambio conformacional tal que el dominio espaciador-1 se desplaza, permitiendo que los residuos de manosa de los glicanos de alta manosa de la enzima lisosomal entren en el sitio catalítico y sean fosforilados. En algunos casos, el dominio de homología del receptor Man-6-P de la subunidad γ (verde) ayudará a guiar los oligosacáridos hacia el sitio catalítico. (Abajo) La enzima mínima que carece del dominio espaciador-1 y del dominio de interacción módulos Notch/DMPAP no se inhibe ni requiere sitios de acoplamiento de proteínas en moléculas sustrato para la fosforilación. Esta enzima se expresa a niveles muy altos y es capaz de fosforilar todas las glicoproteínas solubles que pasan por el Golgi, independientemente de su destino final.

La FIG. 6 muestra un esquema de la organización modular de los diferentes dominios del precursor GlcNAc-1-PT α/β humano y su alineación con la GlcNAc-1-PT de *D. discoideum* y *N. meningitidis*. No se sabe con certeza si la proteína de *D. discoideum* sufre un procesamiento proteolítico como la proteína humana. Las 4 regiones mostradas en verde juntas comprenden el Stealth, un dominio evolutivamente conservado identificado por primera vez en proteínas bacterianas implicadas en la biosíntesis de polisacáridos capsulares.

La FIG. 7 muestra un Western blot de células HEK 293 transfectadas con el precursor α/β WT o con los ADNc mutantes indicados. Los lisados celulares se incubaron con agarosa Ni-NTA para purificar por afinidad el precursor α/β , así como la subunidad β , ya que los diversos constructos tenían, además del epítipo V, una etiqueta de histidina 6X-His en el extremo C-terminal. La punta de flecha indica la pequeña cantidad de subunidad β escindida Q882 observada con la proteína WT, mientras que el * es la β normal debida a la escisión en K928. El mutante R925A también mostró una pequeña cantidad de la β escindida en Q882 mientras que la β escindida en K928 desaparece por completo en este caso. Ambas subunidades β están completamente ausentes con el mutante DS1/R879A/R925A.

La FIG. 8A muestra un esquema de la disposición modular de la subunidad α/β GlcNAc-1-PT y la sustitución de la secuencia espaciador-1 humana por una secuencia enlazadora de 26 aa que comprende residuos Gly y Ser. La FIG. 8B representa el análisis de inmunotransferencia de WT α/β frente a los mutantes de delección DS1 y Δ S1 expresados en células HeLa *GNPTAB*^{-/-} y sondados con anticuerpo anti-V5. La FIG. 8C representa un gráfico que muestra la actividad de fosfotransferasa hacia el azúcar simple α MM, utilizando extractos de células *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con el precursor WT α/β o el ADNc mutante Δ S1. La actividad se normalizó a la concentración de proteína total. La FIG. 8D representa una inmunotransferencia que muestra la inhibición de la actividad de S1P en células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con el precursor α/β WT, el DS1 o el ADNc mutante Δ S1. 24 h después de la transfección se añadió PF-429242 a las células a una concentración final de 10 μ M y las células se incubaron durante otras 24 h antes de ser cosechadas. Se prepararon extractos celulares y 20 μ g de cada lisado se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a Western blotting.

La FIG. 9 muestra imágenes de inmunofluorescencia confocal de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con el precursor α/β WT, el ADNc mutante DS1 o Δ S1 y colocalizadas con los marcadores de Golgi GOLPH4, respectivamente (ver Procedimientos).

La FIG. 10 muestra imágenes de inmunofluorescencia confocal de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con el precursor α/β WT, o con los ADNc mutantes indicados, y colocalizadas con los marcadores de Golgi GOLPH4, respectivamente (Procedimientos).

La FIG. 11 muestra imágenes de inmunofluorescencia confocal de células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con el precursor α/β WT, el ADNc mutante N1-S3 o S1-S3, y colocalizadas con los marcadores de Golgi GOLPH4, respectivamente (ver Procedimientos).

Las FIG. 12A, FIG. 12B y FIG. 12C representan un esquema y gráficos que muestran la expresión de una GlcNAc-1-fosfotransferasa mínima y el análisis de la actividad enzimática. (FIG. 12A) Esquema de la disposición modular de la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa WT y la de la enzima mínima, S1-S3. La enzima mínima se generó sustituyendo la secuencia del espaciador-1 humano por el espaciador-1 de *D. discoideum* y eliminando los aminoácidos 438-928. (FIG. 12B) Las células Expi293F o las células D9 de ratón se co-transfectaron con plásmidos de expresión para las enzimas lisosomales indicadas junto con el vector vacío, el precursor α/β WT o el ADNc mutante S1-S3. El grado de fosforilación mediado por el precursor α/β WT o el mutante S1-S3 se determinó para cada enzima uniéndola a perlas de afinidad CI-MPR y analizando la actividad del material unido como se describe en Procedimientos. Los valores obtenidos con el vector vacío son indicativos de la actividad mediada por la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. (FIG. 12C) Las células HeLa *GNPTAB*^{-/-} se transfectaron conjuntamente con el precursor α/β WT o con el ADNc del mutante de delección S1-S3, junto con plásmidos de expresión para 4 enzimas lisosomales, mientras que las células HeLa parentales se transfectaron únicamente con ADNc para estas últimas y utilizaron la actividad GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. 48 h después de la transfección, las células se marcaron durante 2 h con [2-³H]-manosa, seguido de inmunoprecipitación de las proteínas secretadas en el medio y determinación del porcentaje de N-glicanos que contenían Man-6-P. Se muestran los valores absolutos del % de fosforilación.

Descripción detallada de la invención

Los inventores demuestran que un precursor α/β truncado que carece de un número de elementos de la subunidad α mientras que conserva los dominios catalíticos «Stealth» se expresa a niveles muy altos dando lugar a una actividad catalítica 20 veces mayor que la que se produce con la enzima WT. El precursor α/β truncado estimuló la fosforilación de manosa por encima de los niveles endógenos de diversas proteínas lisosomales y no lisosomales. Además, la enzima truncada aumentó la formación de glicanos con dos residuos de Man-6-P, lo que se traduce en una afinidad mucho mayor por los receptores de Manosa-6-P. La fosforilación de la enzima lisosomal puede incrementarse sustancialmente mediante la cotransfección con el precursor α/β WT o truncado de la GlcNAc-1-fosfotransferasa. La fosforilación aumentada incrementa la unión y la captación por las células. Este efecto se produce incluso con enzimas lisosomales como GalA que son bien fosforiladas por la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. Además, este procedimiento mejora la fosforilación y captación de LAMAN y GAA, dos enzimas lisosomales que son poco fosforiladas por la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. Diversos aspectos de la divulgación se describen con más detalle a continuación.

I. Composiciones

La invención es tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido aislado; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT). En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado; el polinucleótido codifica al menos un polipéptido, el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT). En otro aspecto más, la divulgación proporciona un vector que comprende un polinucleótido; el polinucleótido codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT). En otro aspecto más, la divulgación proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido; el polinucleótido codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT).

En un aspecto, una proteína GlcNAc-1-PT de longitud completa puede incluir 3 subunidades: subunidades α , β y γ . Las subunidades α y β (GlcNAc-1-PT α/β) pueden ser capaces de fosforilar la mayoría de las enzimas lisosomales en ausencia de la subunidad γ . Las subunidades GlcNAc-1-PT α/β pueden incluir diversos dominios conservados. Los dominios conservados de las subunidades GlcNAc-1-PT α/β pueden incluir, dispuestos desde el extremo N- al C-terminal del polipéptido, un dominio espaciador-1 (espaciador-1), un dominio Notch 1 (Notch 1), un dominio Notch 2 (Notch 2), un dominio espaciador-2 (espaciador-2), un dominio de interacción de proteínas asociado a metiltransferasa de ADN (DMAP), un dominio espaciador-3 (espaciador-3) y un dominio espaciador-4 (espaciador-4). La subunidad α puede incluir dispuestos desde el N- al C-terminal del polipéptido un espaciador-1, un Notch 1, un Notch 2, un espaciador-2, y un DMAP. El espaciador-3 puede abarcar la subunidad α y β , y puede incluir el sitio en el que la subunidad α y β pueden escindirse, el sitio de escisión de la subunidad α/β . El espaciador-4 puede estar en la subunidad β .

En un aspecto la divulgación proporciona un polipéptido aislado; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT), en la que el espaciador-1 está suprimido y la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β está suprimida. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido aislado; el polinucleótido codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT), en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β . En otro aspecto más, la divulgación proporciona un vector que comprende un polinucleótido; el polinucleótido codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT), en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β . En otro aspecto más, la divulgación proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido; el polinucleótido codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT), en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β .

(a) GlcNAc-1-fosfotransferasa

En un aspecto la divulgación proporciona una GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT). Como se usa aquí, el término «GlcNAc-1-fosfotransferasa» incluye GlcNAc-1-fosfotransferasa de tipo silvestre, GlcNAc-1-fosfotransferasa mutante, homólogos funcionales de GlcNAc-1-fosfotransferasa y fragmentos de los mismos. La GlcNAc-1-PT es una proteína hexamérica $\alpha_2\beta_2$ codificada por dos genes. La subunidad α y más pequeña está codificada por el gen *GNPTG*, mientras que las subunidades α y β están codificadas como un único precursor α/β por el gen *GNPTAB*. La escisión proteolítica del precursor α/β humano en K928 está mediado por la proteasa Site-1 (S1P) en el Golgi y este corte es esencial para la competencia catalítica de la proteína. La GlcNAc-1-PT realiza el paso inicial y más crucial en la generación de la etiqueta Man-6-P uniéndose selectivamente a determinantes proteicos dependientes de la conformación en hidrolasas ácidas lisosomales y catalizando la transferencia de GlcNAc-1-P desde UDP-GlcNAc a residuos de manosa en glicanos N-ligados de tipo alto en manosa de las hidrolasas. En consecuencia, una GlcNAc-1-PT de la divulgación, incluyendo un homólogo o fragmento funcional, genera una etiqueta Man-6-P. En ciertas realizaciones, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β . La información de secuencia para la secuencia de aminoácidos de la α/β GlcNAc-1-fosfotransferasa humana de longitud completa puede encontrarse utilizando, por ejemplo, el número de acceso GenBank CAJ30014.1. La información de secuencia para la secuencia de longitud completa de ARNm de α/β GlcNAc-1-fosfotransferasa humana puede encontrarse utilizando, por ejemplo, el número de acceso GenBank AM085438.1. En ciertas realizaciones, una α/β GlcNAc-1-fosfotransferasa de la divulgación comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1 (MLFKLLQRQT YTCLSHRYGL YVCFLGVVVT IVSAFQFGEV VLEWNRDQYH VLFDSYRDN AGKSFQNRCL LPMPIDVVYT WVNGLDLELL KELQGVREQM EEEQKAMREI LGKNTTEPTK KSEKQLECLL THCIKVPMLV LDPALPANIT LKDLPSLYPS FHSASDIFNV AKPKNPSTNV SVVVFDSTKD VEDAHSGLLK GNSRQTVWRG YLTTDKEVPG LVLMQDLAFL SGFPPTFKET NQLKTKLPEN LSSKVLLQL YSEASVALLK LNNPKDFQEL NKQTKKNMTI DGKELTISPA YLLWDLAIS QSKQDEDISA SRFEDNEELR YSLRSIERHA PWVRNIFVT NGQIPSWLNL DNPRTIVTH QDVFRNLSHL PTFSSPAIES HIHRIEGLSQ KFIYLNDDVM FGKDVWPDFF YSHSKGQKVY LTWPVPNCAE GCPGSGWIKDG YCDKACNNSA CDWDGGDCSG NSGGSRYIAG GGGTGSIGVG QPWQFGGGIN SVSYCNQGCA NSWLADKFCF QSQVFLSCGF DAGDCGQDNI HELYKIVLLP NQTHYIIPKG ECLPYFSFAE VAKRQVLEGAY SDNPIIRHAS IANKWKTIHL IMHSGMNATT IHFNLTFTQNT NDEEFKMQIT VEVDTREGPK LNSTATQKGYE NLVSPITLLP EAEILFEDIP KEKRFKPKFR HDVNSTRRAQ EEVKIPLVNI SLLPKDAQLS LNTLDLQLEH GDITLKGYNL SKSALLRSFL MNSQHAKIKN QAIITDETND SLVAPQEKQV HKSILPNSLG VSERLQRLTF PAVSVKVN GH DQQGNPPLDL ETTARFRVET HTQKTIGGNV TKEKPPSLIV PLESQMTKEK KITGKEKENS RMEENAENHI GVTEVLLGRK LQHYTDSYLG FLPWEKKKYF QDLLDEEESL KTQLAYFTDS KNTGRQLKDT FADSLRYVNK ILNSKFGFTS RKVPAHMPHM IDRIVMQLQ DMFPEEFDKT SFHKVRHSED MQFAFSYFYY LMSAVQPLNI SQVFLSDVDT QSGVLSDRNI RLTATRIHEL PLSLQDLTGL EHLMLNCSKM LPADITQLNN IPPTQESYYD PNLPPVTKSL VTNCKPVTDK IHKAYKDKNK YRFEIMGEE IAFKMIRTNV SHVVGQLDDI RKNPRKFVCL NDNIDHNH KD AQTVKAVLRD FYESMFPIPS QFELPREYRN RFLHMHLEQE WRAYRDKLKF WTHCVLATLI MFTIFSFFAE QLIALKRKIF PRRRIHKEAS PNRIRV). En otras realizaciones, una GlcNAc-1-fosfotransferasa de la divulgación puede tener aproximadamente un 80% de identidad con SEQ ID NO:1, siempre que tenga la misma actividad funcional que GlcNAc-1-PT. Por ejemplo, una GlcNAc-1-fosfotransferasa de la divulgación puede tener 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:1, siempre que tenga la misma actividad funcional que GlcNAc-1-PT.

Se aprecia que la presente está dirigida a homólogos de GlcNAc-1-PT en otros organismos y no se limita a la GlcNAc-1-PT humana. Se pueden encontrar homólogos en otras especies mediante procedimientos conocidos en la técnica. Para determinar si una proteína tiene una homología significativa o comparte un cierto porcentaje de identidad de secuencia con una secuencia de la invención, la similitud de secuencia puede determinarse mediante algoritmos convencionales, que normalmente permiten la introducción de un pequeño número de espacios para lograr el mejor ajuste. En particular, el «porcentaje de identidad» de dos polipéptidos o dos secuencias de ácido nucleico se determina utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1993). Dicho algoritmo está incorporado en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el

programa BLASTN para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Del mismo modo, pueden realizarse búsquedas de proteínas BLAST con el programa BLASTX para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a un polipéptido de la invención. Para obtener alineaciones separadas con fines de comparación se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov para más detalles.

Un homólogo de GlcNAc-1-PT puede ser al menos 80, 85, 90 o 95% homólogo a GlcNAc-1-PT humana siempre que tenga la misma actividad funcional que GlcNAc-1-PT. En una realización, un homólogo de GlcNAc-1-PT puede ser al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 u 89% homólogo de GlcNAc-1-PT humana. En otra realización, un homólogo de GlcNAc-1-PT puede ser al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% homólogo de GlcNAc-1-PT. En otra realización, un homólogo de GlcNAc-1-PT puede ser un truncamiento o variante que tiene la misma actividad funcional que la GlcNAc-1-PT de longitud completa.

En otras realizaciones, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β , en la que el espaciador-1 está suprimido. Más específicamente, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β , en la que los aminoácidos entre aproximadamente el aminoácido 86 a aproximadamente el aminoácido 322 se suprimen en referencia a SEQ ID NO:1. La delección del espaciador-1 da lugar a una GlcNAc-1-P con mayor capacidad para fosforilar una serie de glicoproteínas no lisosomales que son poco fosforiladas por la GlcNAc-1-P de tipo silvestre. En otras realizaciones, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β , en la que la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β está suprimida. Más específicamente, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β , en la que los aminoácidos entre aproximadamente el aminoácido 438 y aproximadamente el aminoácido 928 se suprimen en referencia a SEQ ID NO:1. En realizaciones específicas, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β , en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β . Más específicamente, una GlcNAc-1-P de la divulgación comprende la subunidad α/β , en la que se suprimen los aminoácidos entre aproximadamente el aminoácido 86 y aproximadamente el aminoácido 322 y se suprimen los aminoácidos entre aproximadamente el aminoácido 438 y aproximadamente el aminoácido 928 en referencia a SEQ ID NO:1. Es importante destacar que la delección no puede extenderse más allá del aminoácido 928. La eliminación del espaciador-1, junto con la región entre Notch1 y el sitio de escisión α/β , da como resultado una GlcNAc-1-P que recuerda a las proteínas bacterianas y las células que expresan esta mínima GlcNAc-1-PT demuestran una actividad drásticamente aumentada hacia el azúcar simple α -metil D-manósido (α MM) y las glicoproteínas no lisosomales como consecuencia de su alto nivel de expresión. Una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT en la que se suprime el espaciador-1 y la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β tiene una actividad catalítica aproximadamente 5 veces mayor que la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT de tipo silvestre. Por ejemplo, una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT en la que se suprime el espaciador-1 y la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β tiene una actividad catalítica aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces o aproximadamente 30 veces mayor que la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT de tipo silvestre. Una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β aumenta el contenido de glicanos con 2 residuos Man-6-P en relación con la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT de tipo silvestre. Por ejemplo, una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β aumenta el contenido de glicanos con 2 residuos Man-6-P en aproximadamente un 1%, aproximadamente un 2%, aproximadamente un 3%, aproximadamente un 4%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 20% o aproximadamente un 25% en relación con la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT de tipo silvestre. En la FIG. 3A se representan otras GlcNAc-1-Ps modificadas de la divulgación.

(b) constructo enzimático

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un constructo enzimático. Un constructo enzimático de la divulgación es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende una GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos «secuencia polinucleotídica de la divulgación» y «constructo enzimático» son intercambiables. La presente divulgación también proporciona polipéptidos aislados codificados por constructos enzimáticos, vectores que comprenden constructos enzimáticos y células aisladas que comprenden dichos vectores.

i. secuencia polinucleotídica

Un constructo enzimático de la divulgación es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende una GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma. En ciertas realizaciones, el constructo enzimático es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido, comprendiendo el polipéptido una subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa. En otra realización, el constructo enzimático es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que el espaciador-1 está suprimido. En otra realización, el constructo enzimático es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que la región entre Notch 1 y el

sitio de escisión α/β está suprimida. En otra realización más, el constructo enzimático es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos un polipéptido; el polipéptido comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β . En una realización diferente, el constructo enzimático es una secuencia polinucleotídica que codifica al menos dos polipéptidos; los polipéptidos comprenden GlcNAc-1-fosfotransferasas o fragmentos de las mismas.

Cuando un polinucleótido de la divulgación codifica más de un polipéptido, el polinucleótido puede comprender más de un promotor enlazado operablemente a cada polinucleótido que codifica un polipéptido. A modo de ejemplo no limitante, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma puede estar unido de forma operable a un primer promotor y un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una segunda GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma puede estar unido de forma operable a un segundo promotor. La primera y la segunda GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma pueden ser iguales o diferentes. El primer y el segundo promotor pueden ser iguales o diferentes. Los promotores se describen con más detalle a continuación.

Alternativamente, cuando más de un polipéptido está codificado por un polinucleótido de la divulgación, el polinucleótido puede estar unido operablemente a un único promotor. En tal realización pueden utilizarse varias estrategias comunes en la técnica para generar más de un producto de expresión. A modo de ejemplo no limitativo, entre los polinucleótidos que codifican los polipéptidos puede insertarse una señal de empalme, un sitio de entrada ribosómica interna (IRES) o un sitio de escisión proteolítico. A modo de ejemplo no limitante, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una primera GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma y una segunda GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma enlazados operablemente a un único promotor puede comprender además una señal de empalme, un IRES o un sitio de escisión proteolítica entre las regiones codificantes de la primera y la segunda GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma.

En cada una de las realizaciones anteriores, «GlcNAc-1-fosfotransferasa», «un fragmento de la misma», «subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa» y «GlcNAc-1-fosfotransferasa S1-S3» pueden ser como se describe en detalle anteriormente en la Sección I(a), que se incorpora por referencia en esta sección.

Las secuencias polinucleotídicas de la divulgación pueden producirse a partir de moléculas de ácidos nucleicos utilizando procedimientos biológicos moleculares conocidos en la técnica. Cualquiera de los procedimientos conocidos por un experto en la materia para la amplificación de fragmentos polinucleotídicos y la inserción de fragmentos polinucleotídicos en un vector puede utilizarse para construir las secuencias polinucleotídicas de la divulgación. Estos procedimientos pueden incluir ADN recombinante *in vitro* y técnicas sintéticas y recombinaciones *in vivo* (Véase Sambrook *et al.* *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

ii. vector

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector que comprende un constructo enzimático de la divulgación. Tal como se utiliza en el presente documento, un vector se define como una molécula de ácido nucleico utilizada como vehículo para transferir material genético. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fásmidos, cósmidos, elementos transponibles, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC), tales como vectores retrovirales (por ejemplo, derivados de vectores del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV, etc.), vectores lentivirales (por ejemplo, derivados del VIH-1, VIH-2, VIS, VIB, VIF, etc.), vectores adenovirales (Ad), incluidas sus formas de replicación competente, de replicación deficiente y sin entrañas, vectores virales adeno-asociados (AAV), vectores del virus simio 40 (SV-40), vectores del virus del papiloma bovino, virus de Epstein-Barr, vectores del virus del herpes, vectores del virus vaccinia, vectores del virus del sarcoma murino de Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino, vectores del virus del sarcoma de Rous.

El vector puede tener un número de copias alto, un número de copias intermedio o un número de copias bajo. El número de copias puede utilizarse para controlar el nivel de expresión del constructo enzimático y como medio para controlar la estabilidad del vector de expresión. En una realización puede utilizarse un vector de alto número de copias. Un vector de alto número de copias puede tener al menos 31, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 copias por célula bacteriana. En otras realizaciones, el vector de alto número de copias puede tener al menos 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 o 400 copias por célula huésped. En una realización alternativa puede utilizarse un vector de bajo número de copias. Por ejemplo, un vector de bajo número de copias puede tener una o al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez copias por célula huésped. En otra realización, puede utilizarse un vector de número de copias intermedio. Por ejemplo, un vector de número de copias intermedio puede tener al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 copias por célula huésped.

Los vectores de la presente divulgación se utilizan típicamente para la expresión de proteínas. Como es bien conocido en la técnica, tales vectores pueden poseer una amplia variedad de orígenes de replicación, múltiples secuencias de clonación, promotores, sitios de unión ribosómica/sitios de entrada ribosómica, sitios de iniciación de traducción, terminadores de transcripción, etc. Los vectores también pueden contener una o más secuencias de polinucleótidos que codifican marcadores seleccionables, informadores y etiquetas peptídicas.

Un ácido nucleico que codifica un constructo enzimático también puede vincularse operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable. Un marcador seleccionable puede usarse para seleccionar e identificar eficientemente las células que han integrado los ácidos nucleicos exógenos. Los marcadores seleccionables confieren a la célula que recibe el ácido nucleico exógeno una ventaja de selección, como la resistencia a una determinada toxina o antibiótico. Ejemplos adecuados de marcadores de resistencia a antibióticos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que codifican proteínas que imparten resistencia a kanamicina, espectomicina, neomicina, gentamicina (G418), ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, puromicina, higromicina, zeocina y blasticidina.

En algunas realizaciones, el vector también puede comprender un casete de transcripción para expresar proteínas reporteras. A modo de ejemplo, las proteínas reporteras pueden incluir una proteína fluorescente, luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, beta-lactamasa, peroxidasa de rábano picante y variantes de las mismas.

Un vector de expresión que codifica un constructo enzimático puede entregarse a la célula utilizando un vector viral o mediante un procedimiento de transferencia no viral. Los vectores virales adecuados para introducir ácidos nucleicos en las células incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, rabdovirus y virus de herpes. Los procedimientos no virales de transferencia de ácidos nucleicos incluyen el ácido nucleico desnudo, los liposomas y los conjugados proteína/ácido nucleico. Un constructo de expresión que codifica un constructo enzimático que se introduce en la célula puede ser lineal o circular, puede ser monocatenaria o bicatenaria, y puede ser ADN, ARN, o cualquier modificación o combinación de los mismos.

Un constructo de expresión que codifica un constructo enzimático puede introducirse en la célula por transfección. Los procedimientos para transfectar ácidos nucleicos son bien conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos de transfección incluyen, pero no se limitan a, transducción viral, transfección catiónica, transfección liposomal, transfección de dendrímero, electroporación, choque térmico, transfección por nucleofección, magnetofección, nanopartículas, entrega de partículas biolísticas (pistola de genes) y reactivos de transfección patentados como Lipofectamine, Dojindo Hilymax, Eugene, jetPEI, Effectene o DreamFect.

Tras la introducción en la célula, un constructo de expresión que codifica un constructo enzimático puede integrarse en un cromosoma. En algunas realizaciones, la integración del constructo de expresión que codifica un constructo enzimático en un cromosoma celular puede lograrse con un elemento móvil. El elemento móvil puede ser un transposón o un retroelemento. Una variedad de transposones es adecuada para su uso en la invención. Entre los ejemplos de transposones de ADN que pueden utilizarse se incluyen el transposón Mu, los transposones del elemento P de *Drosophila* y los miembros de la superfamilia de transposones Tc1/Mariner, como el transposón bella durmiente de los peces. Una variedad de retroelementos es adecuada para su uso en la invención e incluye retrotransposones que contienen LTR y retrotransposones que no son LTR. Ejemplos no limitantes de retrotransposones incluyen Copia y gypsy de *Drosophila melanogaster*, los elementos Ty de *Saccharomyces cerevisiae*, los elementos intercalados largos (LINEs), y los elementos intercalados cortos (SINEs) de eucariotas. Ejemplos adecuados de LINEs incluyen L1 de mamíferos y R2Bm del gusano de seda.

La integración del ácido nucleico exógeno en un cromosoma celular también puede estar mediada por un virus. Los virus que integran ácidos nucleicos en un cromosoma incluyen bacteriófagos, virus adeno-asociados y retrovirus. Los vectores de virus adenoasociados (AAV) pueden proceder de serotipos de AAV de primates humanos o no humanos y sus variantes. Los virus adenoasociados adecuados incluyen AAV de tipo 1, AAV de tipo 2, AAV de tipo 3, AAV de tipo 4, AAV de tipo 5, AAV de tipo 6, AAV de tipo 7, AAV de tipo 8, AAV de tipo 9, AAV de tipo 10, y AAV de tipo 11. Una variedad de retrovirus es adecuada para su uso en la invención. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. El vector retroviral puede ser un alfa-retrovirus, un beta-retrovirus, un gamma-retrovirus, un delta-retrovirus, un épsilon-retrovirus, un lentivirus o un spuma-retrovirus. En una realización, el vector retroviral puede ser un vector lentiviral. El vector lentiviral puede derivarse de lentivirus humanos, simios, felinos, equinos, bovinos o lentivirus que infectan a otras especies de mamíferos. Ejemplos no limitantes de lentivirus adecuados incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) y el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE).

La integración de un constructo de expresión que codifica un constructo enzimático en un cromosoma de la célula puede ser aleatoria. Alternativamente, la integración de un constructo de expresión que codifica un constructo enzimático puede dirigirse a una secuencia o ubicación particular de un cromosoma. En general, el entorno general en el sitio de integración puede afectar si se expresa el constructo de expresión integrado que codifica un constructo enzimático, así como a su nivel de expresión.

Las células transfectadas con el constructo de expresión que codifica un constructo enzimático generalmente se cultivarán según selección para aislar y expandir células en las que el ácido nucleico se ha integrado en un cromosoma. Las células en las que el constructo de expresión que codifica un constructo enzimático se ha integrado cromosómicamente pueden mantenerse mediante selección continua con el marcador seleccionable descrito anteriormente. La presencia y el mantenimiento de la secuencia de ácido nucleico exógena integrada pueden verificarse mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia, como Southern blots, amplificación de secuencias específicas de ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y/o secuenciación de nucleótidos.

Las moléculas de ácido nucleico se insertan en un vector capaz de expresar los polipéptidos de fusión cuando se introducen en una célula huésped apropiada. Las células huéspedes apropiadas incluyen, entre otras, células bacterianas, de levadura, de insecto y de mamífero.

iii. regulación

En ciertos aspectos, la expresión de una secuencia polinucleotídica de la divulgación puede regularse. Dicha regulación puede permitir controlar cuándo y dónde funciona un constructo enzimático.

Los vectores de expresión contienen típicamente uno o más de los siguientes elementos: promotores, terminadores, sitios de enlace ribosómico/sitios de entrada ribosómica y sitios de iniciación de la traducción. Tales elementos pueden utilizarse para controlar la expresión de un constructo enzimático de la divulgación. La expresión de las moléculas de ácido nucleico de la divulgación puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico, de modo que la molécula se exprese en un hospedador transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la divulgación puede ser controlada por cualquier elemento promotor/ potenciador conocido en la técnica. El término «promotor», tal como se utiliza en el presente documento, puede referirse a una molécula sintética o de origen natural capaz de conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico. Un promotor puede ser constitutivo, inducible/reprimible o específico del tipo celular. En determinadas realizaciones, el promotor puede ser constitutivo. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos para células de mamífero incluyen CMV, UBC, EF1 α , SV40, PGK, CAG, CBA/CAGGS/ACTB, CBh, MeCP2, U6 y H1. En otras realizaciones, el promotor puede ser un promotor inducible. El promotor inducible puede seleccionarse del grupo que consiste en: tetraciclina, choque térmico, hormona esteroide, metal pesado, éster de forbol, elemento E1A de adenovirus, interferón y promotores inducibles por suero. En diferentes realizaciones, el promotor puede ser específico del tipo celular. Por ejemplo, pueden usarse promotores específicos de tipo celular para neuronas (por ejemplo, sinapsina), astrocitos (por ejemplo, GFAP), oligodendrocitos (por ejemplo, proteína básica de mielina), microglía (por ejemplo, CX3CR1), células neuroendocrinas (por ejemplo, cromogranina A), células musculares (por ejemplo, desmina, Mb) o cardiomiocitos (por ejemplo, promotor de la cadena pesada de alfa miosina). En una realización ejemplar, un promotor puede ser el promotor Nrl (específico del fotorreceptor de bastón) o el promotor HBB (hemoglobina beta). Un promotor puede comprender además una o más secuencias reguladoras transcripcionales específicas para potenciar aún más la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o temporal de un ácido nucleico. Ejemplos no limitantes de potenciadores incluyen el potenciador CMV y el potenciador SP1.

En una realización en la que más de un polipéptido está codificado por un polinucleótido de la divulgación y el polinucleótido comprende más de un promotor enlazado operablemente a cada polinucleótido que codifica un polipéptido, los promotores pueden ser los mismos o diferentes. El término «enlazado operablemente», tal como se utiliza en el presente documento, significa que la expresión de una secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor con el que está conectado espacialmente. Un promotor puede estar situado 5' (dirección ascendente) de la secuencia de ácido nucleico bajo su control. La distancia entre el promotor y una secuencia de ácido nucleico a expresar puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y la secuencia de ácido nucleico nativa que controla. Como se sabe en la técnica, la variación de esta distancia puede acomodarse sin pérdida de la función del promotor.

iv. célula huésped

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende un vector de la divulgación. La célula puede ser una célula procariota o una célula eucariota. Las células apropiadas incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, de levadura, fúngicas, de insecto y de mamífero. Las células huéspedes según la presente divulgación son células mantenidas *in vitro* en cultivos sustancialmente puros (es decir, células aisladas). Una célula huésped que comprende un vector de la divulgación puede utilizarse para la expresión de proteínas y, opcionalmente, para la purificación. Los procedimientos para expresar y, opcionalmente, purificar una proteína expresada de un huésped son estándar en la técnica.

En algunas realizaciones, la célula huésped que comprende un vector de la divulgación puede usarse para producir un polipéptido codificado por un constructo enzimático de la divulgación. Generalmente, la producción de un polipéptido de la divulgación implica transfectar células huéspedes con un vector que comprende un constructo enzimático y luego cultivar las células para que transcriban y traduzcan el polipéptido deseado. Las

células huéspedes aisladas pueden entonces lisarse para extraer el polipéptido expresado para su posterior purificación.

En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula procariota. Ejemplos no limitantes de células procariotas adecuadas incluyen *E. coli* y otras Enterobacteriaceae, *Escherichia sp.*, *Campylobacter sp.*, *Wolinella sp.*, *Desulfovibrio sp.*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Listeria sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Megasphaera sp.*, *Pectinatus sp.*, *Selenomonas sp.*, *Zymophilus sp.*, *Actinomyces sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Frankia sp.*, *Micromonospora sp.*, *Nocardia sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.*, *Acetobacterium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Helibacterium sp.*, *Heliospirillum sp.*, *Sporomusa sp.*, *Spiroplasma sp.*, *Ureaplasma sp.*, *Erysipelothrix sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Actinobacteria sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Moraxella sp.*, *Helicobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Neisseria sp.*, *Bdellovibrio sp.*, *Hemophilus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia sp.*, *Yersinia sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Actinobacillus sp.*, *Bordetella sp.*, *Brucella sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Cardiobacterium sp.*, *Eikenella sp.*, *Francisella sp.*, *Haemophilus sp.*, *Kingella sp.*, *Pasteurella sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Aeromonas sp.*, *Plesiomonas sp.*, *Legionella sp.* y alfa-proteobacteria como *Wolbachia sp.*, cianobacterias, espiroquetas, bacterias verdes azufradas y verdes no azufradas, cocos gramnegativos, bacilos gramnegativos que son fastidiosos, bacilos gramnegativos fermentadores de glucosa Enterobacteriaceae, bacilos gramnegativos no fermentadores de glucosa, bacilos gramnegativos fermentadores de glucosa, oxidasas positivos. Las células huéspedes bacterianas particularmente útiles para la expresión de proteínas incluyen bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas haloplantis*, *Pseudomonas putida* AC10, *Pseudomonas pseudoflava*, *Bartonella henselae*, *Pseudomonas syringae*, *Caulobacter crescentus*, *Zymomonas mobilis*, *Rhizobium meliloti*, *Myxococcus xanthus* y bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lividans* y *Streptomyces lividans*. *E. coli* es uno de los huéspedes de expresión más utilizados. Por consiguiente, las técnicas de sobreexpresión en *E. coli* están bien desarrolladas y fácilmente disponibles para un experto en la materia. Además, *Pseudomonas fluorescens* se utiliza comúnmente para la producción de alto nivel de proteínas recombinantes (es decir, para el desarrollo de bio-terapéuticos y vacunas).

En algunas realizaciones, una célula huésped es una levadura o una célula fúngica. Las células huéspedes fúngicas particularmente útiles para la expresión de proteínas incluyen *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum*. Las células huéspedes de levadura particularmente útiles para la expresión de proteínas incluyen *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*.

En algunas realizaciones, una célula huésped es una célula de mamífero. Las células huéspedes de mamífero particularmente útiles para la expresión de proteínas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón embrionario humano, *Bos primigenius* y *Mus musculus*. En una realización específica, las células huéspedes son células CHO. Además, la célula huésped de mamífero puede ser una línea celular establecida y comercialmente disponible (por ejemplo, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA). La célula huésped puede ser una célula inmortalizada. Alternativamente, la célula huésped puede ser una célula primaria. Las «células primarias» son células tomadas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecidas para el crecimiento in vitro, que han sufrido muy pocas duplicaciones de población y, por lo tanto, son más representativas de los principales componentes funcionales y características de los tejidos de los que se derivan, en comparación con las líneas celulares tumorigénicas continuas o inmortalizadas artificialmente.

En un aspecto, la célula huésped ha sido diseñada para producir altos niveles de una proteína de interés. Por ejemplo, la célula huésped ha sido diseñada para producir una proteína que se beneficiaría de ser marcada con manosa-6-fosfato (Man-6-P). En ciertas realizaciones, la proteína de interés es una proteína lisosomal. Ejemplos no limitantes de proteínas lisosomales incluyen β -glucocerebrosidasa (GBA), GalA, catepsina D (CathD), enfermedad de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2), β -hexosaminidasa (HEXB), α -galactosidasa (GLA), β -manosidasa (MANBA), alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, α -glucosidasa ácida (GAA) y α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN). En concreto, la proteína lisosomal es la α -glucosidasa ácida (GAA) o la α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN). Estas proteínas son especialmente útiles en combinación con la GlcNAc-1-PT divulgada, ya que pueden estar poco fosforiladas con la GlcNAc-1-PT endógena. En otras realizaciones, la proteína de interés es una proteína no lisosomal. Ejemplos no limitantes de proteínas no lisosomales incluyen DNasa1, renina, factor inhibidor de leucemia (LIF), proteína O-fucosiltransferasa 2 (PoFUT2), glicopepsinógeno (GP), y los dominios A1A2A3 del factor von Willebrand.

v. secuencia polipeptídica

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona uno o más polipéptido(s) aislado(s) codificado(s) por una secuencia polinucleotídica de la divulgación. Las secuencias polinucleotídicas de la divulgación se describen

en detalle en la Sección I(b)i, y se incorporan por referencia en esta sección. Tal como se utiliza en el presente documento, el término «polipéptido aislado» se refiere a un polipéptido que se ha purificado parcial o completamente a partir de la célula de la que se produjo. Los polipéptidos aislados de la divulgación pueden producirse mediante procedimientos de biología molecular conocidos en la técnica. En términos generales, una

5 secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido se inserta en un vector que es capaz de expresar el polipéptido cuando se introduce en una célula huésped apropiada. Los vectores y células huéspedes apropiados se describen en la Sección I(b)iii y en la Sección I(b)iv, respectivamente. Una vez expresados, los polipéptidos pueden obtenerse de las células utilizando procedimientos de purificación comunes. Por ejemplo, si el polipéptido tiene una señal de secreción, los polipéptidos expresados pueden aislarse del sobrenadante

10 del cultivo celular. Alternativamente, los polipéptidos que carecen de señal de secreción pueden purificarse a partir de cuerpos de inclusión y/o extracto celular. Los polipéptidos de la divulgación pueden aislarse del sobrenadante de cultivo, cuerpos de inclusión o extracto celular utilizando cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad al antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía en

15 columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, por ejemplo, Scopes, «Protein Purification», Springer Verlag, N.Y. (1982). El aislamiento de polipéptidos se facilita en gran medida cuando el polipéptido comprende una etiqueta de afinidad o una etiqueta de purificación, como se describe en el presente documento.

20 En una realización, un polipéptido aislado de la divulgación comprende GlcNAc-1-fosfotransferasa o un fragmento de la misma. En otra realización, un polipéptido aislado de la divulgación comprende la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa. En otra realización, un polipéptido aislado de la divulgación comprende la subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que el espaciador-1 está suprimido. En aún otra realización, un polipéptido aislado de la divulgación comprende la subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que

25 la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β está suprimida. En otra realización más, un polipéptido aislado de la divulgación comprende la subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que el espaciador-1 está suprimido y la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β está suprimida.

II. Procedimientos

Los procedimientos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la divulgación

30 proporciona un procedimiento *in vitro* para aumentar la fosforilación de oligosacáridos de una proteína de interés, el procedimiento comprende expresar una GlcNAc-1-PT exógena en una célula. La GlcNAc-1-PT exógena puede ser como se describe en la Sección I(a). La célula puede ser una célula huésped como se describe en la Sección I(b)iv. Específicamente, la célula es una célula CHO. La cantidad de fosforilación puede incrementarse en más del 1% en relación con la fosforilación en presencia de GlcNAc-1-PT endógena

35 solamente. Además, la cantidad de fosforilación puede incrementarse en más del 2%, más del 3%, más del 4%, más del 5%, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 25%, más del 30%, más del 35%, más del 40%, más del 45%, más del 50%, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70% o más del 75% en relación con la fosforilación en presencia de GlcNAc-1-PT endógena únicamente. Específicamente, cuando la GlcNAc-1-PT exógena es la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa, la cantidad de fosforilación puede

40 incrementarse en más del 2%, más del 3%, más del 4%, más del 5%, más del 10%, más del 15%, más del 20% o más del 25% en relación con la fosforilación en presencia de GlcNAc-1-PT endógena únicamente. Además, cuando la GlcNAc-1-PT exógena es la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β , la cantidad de fosforilación puede

45 incrementarse en más del 5%, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 25%, más del 30%, más del 35%, más del 40%, más del 45%, más del 50%, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70% o más del 75% en relación con la fosforilación en presencia de GlcNAc-1-PT endógena únicamente. Además, el procedimiento puede aumentar el contenido de glicanos con 2 residuos Man-6-P. Por ejemplo, una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT en la que se suprime el espaciador-1 y la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β aumenta el contenido de glicanos con 2 residuos Man-6-P en aproximadamente un 1%, aproximadamente un

50 2%, aproximadamente un 3%, aproximadamente un 4%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 20% o aproximadamente un 25% en relación con la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT de tipo silvestre. La proteína de interés es una proteína que se beneficiaría de ser marcada con manosa-6-fosfato (Man-6-P). En ciertas realizaciones, la proteína de interés es una proteína lisosomal. Ejemplos no limitantes de proteínas lisosomales incluyen β -glucocerebrosidasa (GBA), GalA, catepsina D (CathD), enfermedad de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2), β -hexosaminidasa (HEXB), α -galactosidasa (GLA), β -

55 manosidasa (MANBA), alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, α -glucosidasa ácida (GAA) y α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN). Específicamente, la proteína lisosomal es α -glucosidasa ácida (GAA) o α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN). En otras realizaciones, la proteína de interés es una proteína no lisosomal. Ejemplos no limitantes de proteínas no lisosomales incluyen DNasa1, renina, factor inhibidor de leucemia (LIF), proteína O-fucosiltransferasa 2 (PoFUT2), glico-pepsinógeno (GP), y los dominios A1A2A3 del factor de von Willebrand.

60

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento *in vitro* para aumentar la unión de una proteína de interés a receptores (Man-6-P) de superficie celular, y el procedimiento comprende expresar una GlcNAc-

1-PT exógena en una célula. La GlcNAc-1-PT exógena puede ser como se describe en la Sección I(a). La célula puede ser una célula huésped como se describe en la Sección I(b)iv. Específicamente, la célula es una célula CHO. Un aumento de la unión de una proteína de interés a los receptores (Man-6-P) de la superficie celular puede dar lugar a un aumento de la captación de la proteína de interés. La unión puede aumentar en más de 1.5 veces en relación con la fosforilación en presencia de GlcNAc-1-PT endógena solamente. Además, la unión puede aumentar más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 20 veces, más de 30 veces, más de 40 veces, más de 50 veces, más de 60 veces, más de 70 veces, más de 80 veces, más de 90 veces, más de 100 veces, más de 110 veces, más de 120 veces, más de 130 veces, más de 140 veces o más de 150 veces en relación con la unión en presencia de GlcNAc-1-PT endógena solamente. Específicamente, cuando la GlcNAc-1-PT exógena es la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa, la unión puede aumentar más de 1.5 veces, más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 20 veces, más de 30 veces, más de 40 veces, más de 50 veces, más de 60 veces, más de 70 veces, más de 80 veces, más de 90 veces, más de 100 veces, más de 110 veces, más de 120 veces, más de 130 veces, más de 140 veces o más de 150 veces en relación con la unión en presencia de GlcNAc-1-PT endógena solamente. Además, cuando la GlcNAc-1-PT exógena es la subunidad α/β de la GlcNAc-1-fosfotransferasa, en la que se suprime el espaciador-1 y se suprime la región entre Notch 1 y el sitio de escisión α/β , la unión puede aumentar más de 2 veces, más de 3 veces, más de 4 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 20 veces, más de 30 veces, más de 40 veces, más de 50 veces, más de 60 veces, más de 70 veces, más de 80 veces, más de 90 veces, más de 100 veces, más de 110 veces, más de 120 veces o más de 130 veces en relación con la unión en presencia de GlcNAc-1-PT endógena solamente. La proteína de interés es una proteína que se beneficiaría de ser marcada con manosa-6-fosfato (Man-6-P). En ciertas realizaciones, la proteína de interés es una proteína lisosomal. Ejemplos no limitantes de proteínas lisosomales incluyen β -glucocerebrosidasa (GBA), GalA, cathepsina D (CathD), enfermedad de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2), β -hexosaminidasa (HEXB), α -galactosidasa (GLA), β -manosidasa (MANBA), alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, α -glucosidasa ácida (GAA) y α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN). Específicamente, la proteína lisosomal es α -glucosidasa ácida (GAA) o α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN). En otras realizaciones, la proteína de interés es una proteína no lisosomal. Ejemplos no limitantes de proteínas no lisosomales incluyen DNasa1, renina, factor inhibidor de leucemia (LIF), proteína O-fucosiltransferasa 2 (PoFUT2), glico-pepsinógeno (GP), y los dominios A1A2A3 del factor de von Willebrand.

En diversos aspectos, el procedimiento comprende además aislar o purificar la proteína de interés para su uso en terapia de sustitución enzimática. Los procedimientos de aislamiento o purificación de una proteína son conocidos en la técnica. La terapia de reemplazo enzimático (ERT) puede usarse para tratar enfermedades de almacenamiento lisosomal. Ejemplos no limitantes de enzimas (y sus correspondientes enfermedades de almacenamiento lisosómico) para su uso en ERT incluyen glucocerebrosidasa (enfermedad de Gaucher), α -galactosidasa A (enfermedad de Fabry), α -glucosidasa ácida (enfermedad de Pompe), alfa-L-iduronidasa (mucopolisacaridosis I, síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Scheie), iduronato sulfatasa (mucopolisacaridosis II, síndrome de Hunter), arilsulfatasa B (mucopolisacaridosis VI, síndrome de Maroteaux-Lamy). La terapia de sustitución enzimática es una terapia de por vida. Todos los productos se administran por vía intravenosa a través de una vía periférica o un dispositivo de acceso central. Las infusiones suelen realizarse una vez cada 2 semanas, o a veces semanalmente. Utilizando una GlcNAc-1-PT de la divulgación, la enzima preparada puede administrarse a dosis más bajas o a intervalos menos frecuentes. Además, utilizando una GlcNAc-1-PT de la divulgación, las enzimas lisosomales generalmente no disponibles para su uso debido a la baja fosforilación pueden utilizarse para ERT. Además, la producción de GBA que contiene altos niveles de Man-6-P ofrece la oportunidad de restaurar la actividad enzimática en tipos celulares de pacientes con enfermedad de Gaucher que carecen del receptor de manosa.

Ejemplos

Introducción a los Ejemplos 1-4.

La capacidad de los lisosomas para degradar eficientemente el material intracelular y endocitosado depende del tráfico apropiado de las aproximadamente 60 hidrolasas ácidas solubles a este orgánulo. En eucariotas superiores, el proceso de clasificación está mediado por el sistema de reconocimiento de manosa 6-fosfato (Man-6-P). Las hidrolasas ácidas recién sintetizadas adquieren residuos de Man-6-P en el cis-Golgi, que sirven como ligandos de alta afinidad para unirse a los receptores de Man-6-P (MPRs) en la red trans-Golgi y su posterior transporte al sistema endo-lisosomal (1). La enzima cis-Golgi UDP-GlcNAc: enzima lisosomal N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT) realiza el paso inicial y más crucial en la generación de la etiqueta Man-6-P uniéndose selectivamente a determinantes proteicos dependientes de la conformación en hidrolasas ácidas lisosomales y catalizando la transferencia de GlcNAc-1-P de UDP-GlcNAc a residuos de manosa en glicanos N-ligados de tipo manosa alto de las hidrolasas (2). Las glicoproteínas secretoras con idénticos glicanos ligados a N no adquieren la etiqueta Man-6-P cuando atraviesan la vía secretoria. Estudios anteriores de nuestro laboratorio han demostrado que los dos módulos Notch y los dominios de interacción con la proteína asociada a la metiltransferasa del ADN (DMAP) de la GlcNAc-1-PT desempeñan un papel en el reconocimiento específico de los determinantes proteicos de las hidrolasas ácidas lisosomales, lo que da lugar a la fosforilación de sus oligosacáridos con alto contenido en manosa (3). La razón probable por la que las

proteínas N-glicosiladas no lisosomales quedan excluidas de este proceso y se evita que se dirijan incorrectamente a los lisosomas es su falta de tales determinantes.

GlcNAc-1-PT es una proteína hexamérica $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ codificada por dos genes. La subunidad γ más pequeña está codificada por el gen *GNPTG*, mientras que las subunidades α y β están codificadas como un único precursor α/β por el gen *GNPTAB* (4, 5). La escisión proteolítica del precursor α/β humano en K928 está mediada por la proteasa Site-1 (S1P) en el Golgi y esta escisión es esencial para la competencia catalítica de la proteína (6). Además de los dominios de interacción Notch y DMAP, las subunidades α y β también albergan cuatro dominios Stealth que juntos forman el núcleo catalítico de la proteína (FIG. 1A). Los dominios Stealth de todas las GlcNAc-1-PTs eucariotas están muy conservados y se parecen a secuencias de genes bacterianos que codifican transferasas de azúcar-fosfato implicadas en la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular (FIG. 6) (7). Dado que las enzimas bacterianas transfieren los azúcares-fosfatos directamente a los polisacáridos aceptores sin la participación de determinantes proteicos, la opinión actual es que la GlcNAc-1-PT de mamífero, en el curso de la evolución proteica, adquirió los dominios de interacción Notch y DMAP para funcionar en el reconocimiento específico de determinantes proteicos en hidrolasas ácidas lisosomales.

Además, la GlcNAc-1-PT tiene cuatro dominios denominados «espaciadores», de los cuales solo uno, el espaciador-2, se ha caracterizado como el sitio de unión de la subunidad γ (3, 8). Hasta ahora no se ha atribuido ninguna función a las otras regiones espaciadoras. En este estudio investigamos el papel del espaciador-1 en la función de GlcNAc-1-PT. Inesperadamente, encontramos que el espaciador-1 dicta la escisión del precursor α/β precisamente en K928 por la proteasa del sitio-1 (S1P) para permitir una actividad catalítica completa, ya que la eliminación del espaciador-1 resulta en la escisión en un sitio alternativo (Q882) y una enzima catalíticamente deficiente. Además, la delección del espaciador-1 da lugar a una enzima con mayor capacidad para fosforilar una serie de glicoproteínas no lisosomales que son poco fosforiladas por la enzima WT. La eliminación del espaciador-1, junto con la región entre Notch1 y el sitio de escisión α/β , da lugar a una enzima mínima que recuerda a las proteínas bacterianas. Las células que expresan esta GlcNAc-1-PT mínima muestran una actividad drásticamente aumentada hacia el azúcar simple α -metil D-manósido (α MM) y glicoproteínas no lisosomales como consecuencia de su alto nivel de expresión. En conjunto, estos hallazgos revelan un papel novedoso e inesperado para el espaciador-1 en la inhibición de la fosforilación de proteínas no lisosomales y proporcionan nuevos conocimientos sobre cómo GlcNAc-1-PT evolucionó para fosforilar específicamente las enzimas lisosomales, mientras que al mismo tiempo excluye a las proteínas no lisosomales de ser fosforiladas y mal clasificadas a los lisosomas.

Ejemplo 1. La delección del espaciador-1 da lugar a la escisión de α/β de GlcNAc-1-PT en un sitio alternativo.

Para analizar la función del dominio espaciador-1 de la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT, se realizó inicialmente una alineación entre la secuencia de la proteína GlcNAc-1-PT humana y de *D. discoideum* y la secuencia de la N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa bacteriana. Como se muestra en la FIG. 6, la secuencia del espaciador-1 humana es 200 aa más larga que la de las proteínas *D. discoideum* y bacteriana, como es el caso de todas las regiones del espaciador-1 GlcNAc-1-PT de mamíferos para las que se dispone de datos de secuencia. Esto sugiere que la región espaciadora-1 de mamíferos podría desempeñar un papel único no asociado con la secuencia espaciadora-1 de *D. discoideum*. Por lo tanto, la secuencia de 236 aa del espaciador-1 humano se sustituyó por 29 aa de la secuencia de *D. discoideum* a nivel de ADN y el constructo resultante (FIG. 1A, DS1) se transfectó en células *GNPTAB*^{-/-} HeLa generadas por el procedimiento CRISPR/Cas9 (3). Se realizó un análisis Western blot de extractos de células enteras que expresaban el mutante WT y DS1 para determinar si la sustitución del espaciador-1 humano por la secuencia de *D. discoideum* permitía un plegamiento eficiente de la proteína mutante y su salida del retículo endoplásmico (RE) al cis-Golgi, donde el precursor α/β se escinde en las subunidades α y β . Como se muestra en las FIG. 1B y FIG. 1C, la proteína mutante se expresa bien, sale del RE y presenta el 60% de la actividad catalítica de la WT hacia el azúcar simple α MM. Sin embargo, la mayor parte del producto de la subunidad β de la escisión proteolítica migró más lentamente en un gel SDS-PAGE que la subunidad β WT (FIG. 1B, punta de flecha), lo que indica que la mayor parte del mutante DS1 se escinde en un sitio alternativo en relación con la proteína WT que se escinde en K928 (FIG. 1B, *). También se observó una pequeña cantidad de la subunidad β normal con DS1 (FIG. 1B y FIG. 1D, exposición más larga, *). Esto planteó la cuestión de si la escisión alternativa resultante de la eliminación del espaciador-1 se debe a la misma proteasa, S1P, que escinde el precursor WT α/β en K928, o si puede estar implicada una proteasa diferente. Para abordar esta cuestión, tratamos las células con un inhibidor de la S1P, la aminopirrolidinamida PF-429242 (9). La presencia del inhibidor resultó en la pérdida de la formación de la subunidad β tanto en el WT GlcNAc-1-PT como en el mutante DS1 (FIG. 1D), demostrando que la escisión en el sitio alternativo está mediada por la S1P. Si este es el caso, debería existir un sitio de escisión S1P de consenso adicional ubicado en posición N-terminal al sitio de escisión original. Un examen de la secuencia de aminoácidos de α/β de GlcNAc-1-PT reveló que esto es cierto, con el residuo de arginina clave de consenso, R879, en la posición invariante -4, y se postula que la escisión ocurre en Q882 (FIG. 1E) (10). La escisión en Q882 es coherente con el aumento de la masa molecular de la subunidad β observado con la DS1. La mutación de R925 suprime la escisión de WT GlcNAc-1-PT en K928 (FIG. 1F, carril 2). La mutación de R879, por otra parte, no afectó al procesamiento normal del precursor α/β de longitud completa en K928 (FIG. 1F, carril 3), pero suprimió la escisión en Q882 para el mutante DS1, como muestra la pérdida de la subunidad β de migración más lenta (FIG. 1F, carril 6). La cantidad traza de β escindida en K928 en este caso no se vio afectada

(FIG. 1F, carril 6, exposición más larga). La mutación tanto de R925 como de R879 resultó en la pérdida completa de la formación de β (FIG. 1F, carril 7). Estos datos identifican claramente Q882 como un nuevo sitio de escisión de S1P en GlcNAc-1-PT que se utiliza raramente excepto en ausencia de espaciador-1 (FIG. 7).

Dado que la secuencia de 236 aa del espaciador-1 humano fue reemplazada por la secuencia de 29 aa de *D. discoideum*, fue posible que la utilización del sitio de escisión alternativo fuera una consecuencia de la introducción de la secuencia de *D. discoideum* en oposición a la eliminación de la secuencia del espaciador-1 humano. Para excluir esta posibilidad, se hizo otro mutante de delección del espaciador-1 en el que el espaciador-1 humano se sustituyó por un enlazador de 26 aa compuesto por los pequeños residuos Gly y Ser (FIG. 8A, Δ S1). Δ espaciador-1 (Δ S1) se comportó en todos los aspectos de forma similar a DS1, en el sentido de que el procesamiento proteolítico mediado por S1P dio lugar a la escisión en su mayor parte en el nuevo sitio (Q882) (FIG. 8B), y Δ S1 tenía el 40% de la actividad WT hacia α MM (FIG. 8C). Además, el inhibidor de S1P, PF-429242, bloqueó la formación de la subunidad β con Δ S1 como lo hizo con WT y el mutante DS1 de GlcNAc-1-PT (FIG. 8D). Además, tanto DS1 como Δ S1 mostraron una localización en el Golgi idéntica a la de WT GlcNAc-1-PT (FIG. 9), descartando la mala localización de estos dos mutantes como posible causa de la alteración de la escisión. Estos resultados muestran inequívocamente que la presencia de la secuencia espaciadora-1 de 236aa en la GlcNAc-1-PT humana asegura la escisión en K928 en lugar de Q882.

Ejemplo 2. La escisión en Q882 da lugar a una GlcNAc-1-PT inactiva.

El procesamiento proteolítico del precursor GlcNAc-1-PT α/β en el Golgi en el residuo K928 es imperativo para una enzima catalíticamente activa (5, 11). Dado que hay dos sitios de escisión de S1P en α/β , esto plantea la cuestión de si la escisión en el nuevo sitio en lugar de en K928 también da lugar a una enzima activa. Con el fin de abordar esta cuestión, la actividad de los mutantes puntuales que se muestran en la FIG. 1F hacia α MM (FIG. 1C) y una serie de enzimas lisosomales, (FIG. 1G) fueron probados, tanto en el contexto de WT del precursor de α/β GlcNAc-1-PT, así como del mutante DS1. Los distintos constructos se expresaron en células HeLa *GNPTAB*^{-/-} y 48 h después de la transfección, se prepararon extractos celulares y se guardó una alícuota de cada uno para realizar el ensayo de actividad α MM (FIG. 1C). Los extractos restantes se incubaron con perlas que contenían (CI)-MPR catión-independiente inmovilizada para unir las enzimas lisosomales que habían sido fosforiladas. Se lavaron las perlas y se ensayó la extensión de unión de tres enzimas lisosomales como se describe en Procedimientos (FIG. 1G). Como se muestra en las FIG. 1C y FIG. 1G, el mutante R925A en el contexto del precursor α/β WT solo tenía una actividad de fondo hacia las enzimas α MM y lisosomales, en concordancia con la hipótesis predominante de que la escisión del precursor α/β es imprescindible para la actividad. R879A/WT, por otro lado, mostró un 30% de la actividad hacia α MM y entre un 110-125% de la actividad hacia las tres enzimas lisosomales en comparación con el precursor α/β WT. Cuando estas mutaciones puntuales se probaron individualmente o juntas en el fondo DS1, los distintos mutantes seguían conservando el 20-30% de la actividad α MM WT (FIG. 1C). El hecho de que el mutante R925A/R879A/DS1, que no se procesa proteolíticamente en absoluto, retuviera una actividad sustancial hacia α MM (FIG. 1C) y niveles bajos de actividad hacia enzimas lisosomales (FIG. 1G) indica que α/β no escindida en ausencia de espaciador-1 es parcialmente activa. Todos los mutantes mostraron una localización en el Golgi idéntica a la del WT (FIG. 10). Estos resultados muestran que la actividad catalítica hacia enzimas lisosomales asociada con DS1 se debe a una combinación de la pequeña cantidad de β originada por la escisión en K928 más la actividad aportada por el precursor de α/β , siendo inactiva la forma mayoritaria de β que se escinde en Q882.

Ejemplo 3. La delección del espaciador-1 aumenta la fosforilación de varias glicoproteínas no lisosomales.

Se determinó la fosforilación total en manosa de glicoproteínas solubles en células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas con WT o el constructo mutante DS1, o con el vector solo. 48 h después de la transfección, las células se marcaron durante 2 h con [2-³H]manosa y, a continuación se cosecharon, se lavaron y se lisaron en regulador sin detergente, seguido de ultracentrifugación para separar las proteínas de membrana de las fracciones solubles. A continuación, las fracciones solubles se incubaron con CI-MPR inmovilizada para que se uniera específicamente a las proteínas modificadas con Man-6-P, y luego se analizó su contenido de glicoproteínas marcadas con [2-³H]manosa como se describe en Procedimientos. Sorprendentemente, después de restar el valor del vector solo, el mutante DS1 dio sistemáticamente un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo en el nivel de fosforilación del total de glicoproteínas solubles en comparación con el constructo de WT (FIG. 2A). El grado de fosforilación de las proteínas lisosomales, GalA, Catepsina D (CathD), y la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2 (NPC2) ya sea por WT o DS1 también se midió utilizando etiquetado con [2-³H]manosa, inmunoprecipitación y análisis directo de glicanos como se describe en Procedimientos. Las tres enzimas lisosomales mostraron un grado similar de fosforilación, independientemente de si se había co-transfectado el constructo WT o el DS1 en las células HeLa *GNPTAB*^{-/-} junto con vectores de expresión para las enzimas individuales (FIG. 2B, panel izquierdo, valor WT fijado en 1.0). Tomados en conjunto, estos hallazgos plantearon la posibilidad de que el aumento observado en la fosforilación total por DS1 se debiera a la fosforilación de glicoproteínas no lisosomales además de las proteínas lisosomales. Para determinar si este era el caso, los cADNs para las glicoproteínas no lisosomales DNasa1, Renina, factor inhibidor de la leucemia (LIF) y proteína O-fucosiltransferasa 2 (PoFUT2) fueron co-transfectados junto con el precursor WT α/β o el cADN mutante DS1, y el grado de fosforilación cuantificado por etiquetado con [2-³H]manosa. Estas glicoproteínas fueron seleccionadas para el análisis ya que se sabía que adquirirían bajos

niveles de la etiqueta Man-6-P aunque no son proteínas lisosomales por naturaleza (12-15). En los cuatro casos, el grado de fosforilación de manosa mediado por DS1 fue 1.5-2 veces más del alcanzado con el constructo WT (FIG. 2B, panel derecho). En consonancia con esto, la renina, pero no la NPC2, mostró una mayor unión al CI-MPR inmovilizado cuando los cADNs de estas dos proteínas fueron co-transfectados con DS1 en relación con el precursor WT α/β (FIG. 2C). Ni el glico-pepsinógeno (GP) ni las glicoproteínas de membrana, Lamp1 y Lamp2, mostraron unión alguna en estas condiciones (FIG. 2C). Estos resultados muestran que, en ausencia de espaciador-1, aumenta la fosforilación mediada por las subunidades α/β modificadas de un subconjunto de sustratos no lisosomales. En conjunto, estos datos demuestran que espaciador-1 dicta que la escisión del precursor GlcNAc-1-PT α/β se produce casi exclusivamente en K928, y funciona para minimizar la fosforilación de una serie de glicoproteínas no lisosomales.

Ejemplo 4. La delección de los aminoácidos 438-926 da lugar a una expresión de alto nivel de una GlcNAc-1-PT activa.

Anteriormente se demostró que las dos repeticiones Notch junto con el dominio de interacción DMAP de la subunidad α median el reconocimiento selectivo de enzimas lisosomales (FIG. 3A, WT α/β). La delección de esta región (FIG. 3A, N1-D) redujo drásticamente la fosforilación del total de glicoproteínas solubles determinada por el etiquetado con [2-³H]manosa (FIG. 3B). Dado que la mayoría de las proteínas fosforiladas por GlcNAc-1-PT son de hecho proteínas lisosomales, este resultado en ausencia de la región N1-D no es sorprendente. En consecuencia, la fosforilación de β -hexosaminidasa (HEXB), α -Galactosidasa (GLA), y β -Mannosidasa (MANBA), medida por la capacidad de unirse a CI-MPR inmovilizado, fue casi completamente abrogada (FIG. 3C). A la luz del hallazgo de que el espaciador-1 actúa como un dominio inhibitorio, se planteó la hipótesis de que la delección del espaciador-1 en combinación con N1-D (FIG. 3A, S1-D) puede superar parcialmente la incapacidad de GlcNAc-1-PT que carece de los dos módulos Notch y del dominio de interacción DMAP para fosforilar enzimas lisosomales. Esta predicción se ve confirmada por los resultados que muestran un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo en la fosforilación de proteínas solubles totales mediada por el mutante S1-D en relación con N1-D (FIG. 3B, compárese N1-D vs S1-D), así como un pequeño aumento en la fosforilación de HEXB, GLA, y MANBA (14%, 13% y 5%, respectivamente de los valores WT) (FIG. 3C). Dado que la actividad de los mutantes N1-D y S1-D hacia el azúcar simple aMM es similar (FIG. 3E, N1-D vs S1-D), estos aumentos en la fosforilación de enzimas lisosomales mediada por el mutante de delección S1-D se explican mejor por la pérdida de la función inhibitoria del espaciador-1.

Se suprimieron dominios adicionales del precursor de GlcNAc-1-PT α/β y se comprobó que seguían conservando la actividad catalítica. La delección de todos los aa desde el comienzo de Notch 1 (C438) hasta K928, que incluía la mayor parte del espaciador-3, dio como resultado una forma truncada de GlcNAc-1-PT (FIG. 3A, N1-S3) que se expresó aproximadamente 10 veces más que WT en las células HeLa *GNPTAB*^{-/-} (FIG. 3D, compárense carriles 3 y 6), y a pesar de la ausencia de las dos repeticiones Notch y del dominio de interacción DMAP, este mutante restauró la fosforilación total de glicoproteínas solubles a niveles WT (FIG. 3B, compárese WT vs N1-S3). El mutante no sufrió procesamiento proteolítico ya que la región eliminada se extendía hasta el sitio de escisión (FIG. 3D), sin embargo, mostró una actividad catalítica drásticamente incrementada hacia el azúcar simple aMM (FIG. 3E). Este resultado demostró que la escisión del precursor α/β no es un requisito *per se* para la actividad catalítica. No se toleraron delecciones más allá de K928.

Se determinó el resultado de eliminar el espaciador-1 en el contexto de N1-S3. Este nuevo constructo (FIG. 3A, S1-S3) dio lugar a una forma truncada adicional del precursor de GlcNAc-1-PT α/β que también mostró una expresión drásticamente mejorada (FIG. 3D, compárense carriles 3 y 7) y actividad catalítica hacia aMM, a niveles similares a N1-S3 (FIG. 3E). Del modo más notable, la fosforilación total de glicoproteínas solubles mediada por S1-S3 aumentó más de 3 veces sobre WT, mientras que N1-S3 fue similar a WT (FIG. 3B, compárese WT, N1-S3 y S1-S3). Dado que la única diferencia entre S1-S3 y N1-S3 es la ausencia de espaciador-1, estos resultados aportan más pruebas de la función inhibitoria del espaciador-1. La fosforilación mediada por S1-S3 de las proteínas no lisosomales Renina, PoFut2, GP y los dominios A1A2A3 del factor de von Willebrand también aumentó en relación con N1-S3 (FIG. 3F), al igual que ocurrió con las proteínas lisosomales HEXB, GLA y MANBA (FIG. 3G). Los cuatro mutantes (N1-D, S1-D, N1-S3, y S1-S3) se localizaron en el Golgi, de forma similar al WT (FIG. 11).

Para obtener medidas más cuantitativas del grado de formación de Man-6-P mediada por el mutante S1-S3, se realizó el etiquetado con [2-³H]manosa de células cotransfectadas con ADNc para LIF, Renina, PoFut2 y DNasa 1 junto con GlcNAc-1-PT WT o el ADNc del precursor α/β mutante S1-S3. La coexpresión de cada una de estas proteínas con S1-S3 dio lugar a un aumento de 2-4 veces en la fosforilación en relación con WT (FIG. 4), de acuerdo con la expresión marcadamente mejorada y el aumento concomitante en la actividad hacia aMM (FIG. 3D y FIG. 3E). La fosforilación de estas proteínas fue ligeramente más de la alcanzada por el mutante DS1 (compárese la FIG. 4 con la FIG. 2B).

Discusión para los Ejemplos 1-4.

Los módulos Notch y el dominio de interacción DMAP de GlcNAc-1-PT tienen papeles esenciales en el reconocimiento selectivo de proteínas lisosomales y la fosforilación de sus glicanos ligados a N (3, 16). Muchas

otras glicoproteínas que atraviesan la vía secretora presentan glicanos ligados al N muy similares o idénticos que no se fosforilan o adquieren solo niveles bajos de la etiqueta Man-6-P (17). La explicación predominante para esta observación es que, a diferencia de las proteínas lisosomales, las proteínas no lisosomales carecen de los determinantes estructurales que son reconocidos y unidos por los módulos Notch y/o el dominio de interacción DMAP de GlcNAc-1-PT. Así pues, la presencia de un oligosacárido con alto contenido en manosa en una proteína es insuficiente por sí sola para la fosforilación *in vivo* del glicano por GlcNAc-1-PT. *In vitro*, la GlcNAc-1-PT es capaz de fosforilar el azúcar simple, αMM, pero la Km de la enzima para este sustrato es mucho más de tres órdenes de magnitud superior a la de una enzima lisosomal, lo que ilustra el papel clave de los sitios de acoplamiento de proteínas en las proteínas lisosomales para la GlcNAc-1-PT (18). Un hallazgo clave de este estudio es que, además de reconocer y fosforilar específicamente proteínas lisosomales, la GlcNAc-1-PT contiene elementos (espaciador-1) que sirven para evitar la fosforilación de proteínas no lisosomales. Esta es la primera función asignada al dominio espaciador-1. El espaciador-1 de la GlcNAc-1-PT humana tiene 236 aa de longitud y está muy conservado entre las especies vertebradas. Tiene una estructura definida (PDB ID:2N6D), consistente con una función distinta a la de solo servir como «espaciador» (19). Por otra parte, la región espaciadora-1 del eucariota inferior *D. discoideum* tiene una longitud similar a la de la N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa bacteriana de *N. meningitidis* (FIG. 6) y es muy improbable que funcione del mismo modo que la secuencia humana. No existe una identidad significativa a nivel de aa entre la secuencia del espaciador-1 humana y la del espaciador-1 de *D. discoideum*. Dado que los dominios Stealth 1 y 2 que la flanquean son muy similares entre las dos especies, la GlcNAc-1-PT humana podría tolerar la sustitución de la secuencia humana por la de *D. discoideum*. La expresión de esta quimera en células de HeLa *GNPTAB*^{-/-} produjo un resultado inesperado en las de DS1, aunque plegada eficientemente en el ER y transportada al cis-Golgi igual que la enzima WT, fue procesada proteolíticamente de forma diferente en este último compartimento. El uso del inhibidor de S1P PF-429242 demostró que era la S1P la que mediaba esta escisión alternativa. En un estudio reciente en el que se analizaron las mutaciones de pacientes con GlcNAc-1-PT, Velho *et al.* informaron de que una delección en el marco de los residuos Y937 a M972 provocaba la escisión del precursor αβ por S1P en un sitio alternativo en dirección ascendente dentro de la subunidad, aunque el estudio no identificó el nuevo sitio (20). La identificación de Q882 como el sitio de escisión alternativo concuerda con la mayor masa molecular de la subunidad β observada con DS1. La razón por la que la S1P se escinde en Q882 en lugar de en K928 dentro de la subunidad α en ausencia del espaciador-1 no está clara en este momento. A la luz del hallazgo de que la delección de los residuos 937-972 también dio lugar a la escisión en el nuevo sitio, una posibilidad es que el espaciador-1 interactúa con alguna región del espaciador-3 (aa 819-955, FIG. 1) y por lo tanto influye en donde se escinde la S1P. Una explicación alternativa para el uso del nuevo sitio por S1P en ausencia del espaciador-1 es que el impedimento estérico normalmente proporcionado por este dominio para prevenir la escisión en Q882 ya no está presente, permitiendo que S1P ahora se escinda principalmente en Q882, aunque una pequeña cantidad de precursor también se escinde en K928. Curiosamente, se determinó que WT GlcNAc-1-PT produce una pequeña cantidad de la enzima catalíticamente inactiva como resultado del procesamiento proteolítico en Q882. Estos resultados plantean la posibilidad de que la GlcNAc-1-PT vertebrada adquiriera el espaciador-1 para facilitar la escisión en K928 y maximizar su eficiencia catalítica.

Además de dictar el sitio de escisión utilizado por S1P para generar la forma correctamente procesada de GlcNAc-1-PT, los resultados también muestran que el espaciador-1 tiene un papel importante en minimizar la fosforilación de los glicanos de alta manosa de enzimas no lisosomales. Ha sido bien documentado que un número de glicoproteínas no lisosomales, incluyendo DNasa I, Renina, LIF, y PoFut2 adquieren bajos niveles de la etiqueta Man-6-P en sus cadenas de oligosacáridos. Aunque el significado fisiológico del bajo nivel de modificación Man-6-P de estas proteínas no está claro, parece probable que la fosforilación extensiva de estas proteínas por GlcNAc-1-PT sería contraproducente para una célula ya que las proteínas modificadas Man-6-P serían segregadas de la vía secretora para su entrega al compartimento endosomal/lisosomal. Los datos que muestran un aumento de 1.5-2 veces en la fosforilación mediada por DS1 sobre la enzima WT de DNasa I, Renina, LIF, y PoFut2 indican un papel para el espaciador-1 en la inhibición de la fosforilación de proteínas no lisosomales.

Anteriormente se demostró que la delección de los dos módulos Notch y el dominio de interacción DMAP (N1-D) prácticamente abolía la actividad de fosforilación del mutante GlcNAc-1-PT hacia todas las enzimas lisosomales ensayadas (3). En este sentido, es interesante que la delección del espaciador-1, cuando se combinó con la delección de Notch1-DMAP (S1-D), fue capaz de restaurar los bajos niveles de fosforilación de HEXB, GLA y MANBA (14%, 13% y 5%, respectivamente, de los valores WT). Dado que el mutante N1-S3 no requiere procesamiento proteolítico para su actividad catalítica, sirve como un buen control para evaluar el impacto de la delección del espaciador-1 en el mismo contexto. Este nuevo constructo, S1-S3, que se asemeja a las transferasas de fosfato de azúcar bacterianas (FIG. 6), se expresó a altos niveles, similares a los obtenidos con N1-S3, y tuvo una actividad similar hacia αMM. Sin embargo, el constructo S1-S3 incrementó la fosforilación del total de glicoproteínas solubles en casi 4 veces sobre WT, mientras que el valor de N1-S3 fue similar a WT. La fosforilación mediada por S1-S3 de las enzimas lisosomales HEXB, GLA y MANBA también aumentó en comparación con N1-S3, al igual que la fosforilación de las proteínas glicoproteínas no lisosomales glicopepsinógeno y los dominios A1A2A3 de vWF. La capacidad del constructo S1-S3 para fosforilar proteínas no

lisosomales sobre las que no actúa la enzima WT indica que puede funcionar en ausencia de sitios de acoplamiento de proteínas, de forma similar a las transferasas de fosfato de azúcar bacterianas.

Tomados en conjunto, estos hallazgos proporcionan apoyo a la hipótesis de que el precursor de GlcNAc-1-PT α/β adquirió en el curso de la evolución de los vertebrados dominios reguladores tanto positivos (módulos Notch y dominio de interacción DMAP) como negativos (espaciador-1) que sirven para facilitar la fosforilación de proteínas lisosomales, negando simultáneamente la capacidad inherente de la enzima para fosforilar glicoproteínas no lisosomales. Basándonos en estos hallazgos, proponemos el siguiente modelo para explicar cómo funciona la GlcNAc-1-PT. En el estado basal (FIG. 5A), el dominio espaciador-1 interfiere con el enganche del oligosacárido al sitio catalítico formado por los cuatro dominios Stealth. Tras la unión del sitio de acoplamiento de la proteína de la enzima lisosomal a los módulos Notch y al dominio de interacción DMAP, se produce un cambio conformacional tal que el dominio espaciador-1 se desplaza, permitiendo que los residuos de los glicanos de alta manosa de la enzima lisosomal entren en el sitio catalítico y sean fosforilados. En algunos casos, el dominio de homología del receptor de manosa-6-fosfato de la subunidad y ayudará a guiar los oligosacáridos hacia el sitio catalítico. Las glicoproteínas no lisosomales de unión débil, como la DNasa I, pueden ser incapaces de inducir el cambio conformacional necesario para desplazar el espaciador-1, lo que limita el alcance de su fosforilación. Al suprimir el espaciador-1, aumenta la fosforilación de estas proteínas. Las glicoproteínas no lisosomales que carecen totalmente de los determinantes estructurales para la unión de los módulos Notch y el dominio de interacción DMAP no se fosforilan en absoluto. La eliminación del espaciador-1 junto con los elementos N1-S3 da como resultado una enzima altamente expresada con plena actividad catalítica, lo que le permite fosforilar todas las glicoproteínas solubles que pasan por el Golgi (FIG. 5B).

Procedimientos para los Ejemplos 1-4.

Líneas celulares - La línea celular de *GNPTAB*^{-/-} HeLa se ha descrito en detalle en otro lugar (3). Las células se mantuvieron en DMEM (Life Technologies) que contenía 0.11 g/L de piruvato sódico y 4.5 g/L de glucosa, suplementado con 10% (vol/vol) de FBS (Atlanta Biologicals), 100,000 U/L de penicilina, 100 mg/L de estreptomycin (Life Technologies) y 2 mM de L-glutamina (Life Technologies).

Constructos de ADN - El *GNPTAB*-V5/His humano en pcADN6 ha sido descrito (11). Los diversos constructos de delección α/β se realizaron mediante un proceso de PCR de superposición-extensión (OE) de 2 pasos en el que un fragmento de restricción generado por PCR que codifica la delección en cuestión se intercambió por el ADNc nativo dentro de la misma región. Para generar el constructo DS1, se sintetizó un fragmento del gen gBlocks de 0.5 kb (IDT Inc.) que codificaba la secuencia espaciador-1 de *D. discoideum* junto con las secuencias Stealth1 y Stealth 2 humanas y se utilizó en el primer paso de la OE-PCR. Las mutaciones puntuales se generaron mediante el procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange y se confirmó que todas las secuencias eran correctas mediante secuenciación de ADN.

El constructo de ADNc de LIF fue amablemente proporcionada por Richard Steet (Universidad de Georgia, Athens, GA), mientras que el ADNc de PoFut2-myc fue un regalo de Robert Haltiwanger (Universidad de Georgia, Athens, GA). Se han descrito DNasa I, glicopepsinógeno, CathD-myc, a-GalA y NPC2-myc (3, 12, 21). El ADNc de Renina-HA se adquirió de Addgene (Cambridge, MA), mientras que el plásmido, vWF-A1A2A3-Strep-pCADN6, fue proporcionado por J. Evan Sadler (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO).

Microscopía de inmunofluorescencia - Para visualizar la localización subcelular de WT α/β y los diversos mutantes, los diferentes constructos se transfectaron en células *GNPTAB*^{-/-} HeLa utilizando Lipofectamine 3000 (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 24 h después de la transfección, se fijaron las células y se detectaron las subunidades α/β con un anticuerpo monoclonal anti-V5 de ratón (Life Technologies). El marcador de Golgi, GOLPH4, se detectó con anticuerpo policlonal de conejo anti-GOLPH4 (Abcam), respectivamente. Las células procesadas se montaron en medio de montaje anti-atenuación ProLong® Gold (Life Technologies), y las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal LSM880 (Carl Zeiss Inc.). Las imágenes se analizaron con el software Image J (Fiji).

Western blotting - Las proteínas resueltas por SDS-PAGE en condiciones reductoras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron con los anticuerpos indicados en las leyendas de las figuras.

Experimentos de etiquetado con [2-³H]manosa para glicoproteínas solubles totales - Los experimentos de etiquetado se realizaron con células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas como sigue: 48 h después de la transfección, las células en placas de 6 pocillos se incubaron con 10 μ Ci de [2-³H]manosa (Perkin Elmer) durante 2 h. Después del pulso de 2 h, las células se lavaron dos veces con PBS y se cosecharon, luego se suspendieron de nuevo en regulador sin detergente que contenía 25 mM de Tris.Cl (pH 7.2) y 150 mM NaCl a 4°C con un cóctel inhibidor de proteasa (Life Technologies). Las células se lisaron por sonicación y luego se sometieron a ultracentrifugación a 100,000 $\times$ g durante 1 h para separar las proteínas de membrana de la fracción soluble. A continuación, 100 μ l de la fracción soluble se incubaron con CI-MPR purificada que se conjugó covalentemente con la Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno para precipitar las

glicoproteínas fosforiladas con manosa, mientras que 10 µl de la fracción soluble se precipitaron con ácido fosfotúngstico al 1.5% para obtener la incorporación total de la etiqueta [2-³H]manosa en las proteínas solubles. Este procedimiento permitió la cuantificación precisa de todas las glicoproteínas marcadas con manosa que fueron fosforiladas por WT o GlcNAc-1-PT mutante.

- 5 Experimentos de etiquetado con [2-³H]manosa para enzimas lisosomales - Los experimentos de etiquetado se realizaron con células HeLa *GNPTAB*^{-/-} transfectadas de la siguiente manera: 48 h después de la transfección, las células en placas de cultivo tisular de 60 mm se incubaron con 50-150 µCi de [2-³H]manosa (Perkin Elmer) durante 2 h, seguido de la adición de medio completo que contenía 5 mM de glucosa, 5 mM de manosa y 10 mM de NH₄Cl para detener la captación de manosa e inducir la secreción. Las células se incubaron durante 3 h más antes de recoger el medio. En varios experimentos se prepararon extractos celulares y se sometieron a Western blotting para determinar el contenido de subunidad β con el fin de confirmar que los constructos se expresaban a niveles comparables.

- 15 Inmunoprecipitación y análisis de oligosacáridos - Las hidrolasas ácidas secretadas en el medio se inmunoprecipitaron, y los oligosacáridos se aislaron y analizaron esencialmente como se describió en detalle anteriormente (23). Para los experimentos con CathD-myc, NPC2-myc, PoFut2-myc y Renin-HA, se ligaron previamente 20 µl de anticuerpo monoclonal anti-myc (Santa Cruz Biotechnology) o 5 µl de anticuerpo monoclonal anti-HA (Sigma-Aldrich) a 100 µl de perlas de proteína G-agarosa-PLUS (Santa Cruz Biotechnology) antes de la inmunoprecipitación de las hidrolasas lisosomales marcadas de los medios. En el caso de GLA, DNasa I y LIF, las enzimas secretadas se inmunoprecipitaron con perlas de proteína G-agarosa-PLUS previamente enlazadas a anticuerpos anti-β-Gal (Amicus Therapeutics) y perlas de rProteinA-agarose (RepliGen) enlazadas previamente a anticuerpos anti-DNasa I (Sigma, St. Louis, MO) o anticuerpo anti-LIF (proporcionados generosamente por Frederic Blanchard, Universidad de Nantes, Nantes, Francia). El material inmunoprecipitado se trató con Endo H (NEB) y se filtró con Ultracel-10K (EMD Millipore). El filtrado que contenía glicanos de alta manosa neutros y fosforilados se trató con ácido suave para eliminar cualquier residuo de N-acetilglucosamina todavía unido a las fracciones de fosfato y se aplicó a una matriz de columna QAE para separar los oligosacáridos con cero, uno o dos residuos de Man-6-P. El retenido que contenía oligosacáridos complejos resistentes a Endo H se trató con Pronase (Roche Diagnostics) y se fraccionó en ConA-sepharose 4B (GE Healthcare). Se determinó el contenido de [2-³H]-manosa de cada fracción y se calculó el porcentaje de fosforilación tal como se ha descrito (23). En todos los casos, se restaron los valores obtenidos con la transfección simulada.

Referencias para los Ejemplos 1-4.

1. Kornfeld S (1986) Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *The Journal of clinical investigation* 77(1):1-6.
2. Reitman ML & Kornfeld S (1981) Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *The Journal of biological chemistry* 256(23):11977-11980.
3. van Meel E, et al. (2016) Multiple Domains of GlcNAc-1-phosphotransferase Mediate Recognition of Lysosomal Enzymes. *The Journal of biological chemistry* 291 (15):8295-8307.
4. Bao M, Booth JL, Elmendorf BJ, & Canfield WM (1996) Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *The Journal of biological chemistry* 271 (49):31437-31445.
5. Kudo M, et al. (2005) The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA. *The Journal of biological chemistry* 280(43):36141-36149.
6. Marschner K, Kollmann K, Schweizer M, Bräulke T, & Pohl S (2011) A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* 333(6038):87-90.
7. Sperisen P, Schmid CD, Bucher P, & Zilian O (2005) Stealth proteins: in silico identification of a novel protein family rendering bacterial pathogens invisible to host immune defense. *PLoS computational biology* 1(6):e63.
8. De Pace R, et al. (2015) Subunit interactions of the disease-related hexameric GlcNAc-1-phosphotransferase complex. *Human molecular genetics* 24(23):6826-6835.
9. Hay BA, et al. (2007) Aminopyrrolidineamide inhibitors of site-1 protease. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(16):4411-4414.
10. Elagoz A, Benjannet S, Mammabassi A, Wickham L, & Seidah NG (2002) Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *The Journal of biological chemistry* 277(13):11265-11275.

11. Qian V, et al. (2015) Analysis of Mucopolidosis II/III *GNPTAB* Missense Mutations Identifies Domains of UDP-GlcNAc:lysosomal Enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase Involved in Catalytic Function and Lysosomal Enzyme Recognition. *The Journal of biological chemistry* 290(5):30453056.
12. Nishikawa A, Nanda A, Gregory W, Frenz J, & Kornfeld S (1999) Identification of amino acids that modulate mannose phosphorylation of mouse DNase I, a secretory glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* 274(27):19309-19315.
13. Blanchard F, et al. (1998) The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a nanomolar affinity receptor for glycosylated human leukemia inhibitory factor. *The Journal of biological chemistry* 273(33):20886-20893.
14. Faust PL, Chirgwin JM, & Kornfeld S (1987) Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *The Journal of cell biology* 105(5):1947-1955.
15. Sleat DE, Zheng H, Qian M, & Lobel P (2006) Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 5(4):686-701.
16. Qian Y, Flanagan-Steet H, van Meel E, Steet R, & Kornfeld SA (2013) The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(25):10246-10251.
17. Sleat DE, et al. (2013) Extending the mannose 6-phosphate glycoproteome by high resolution/accuracy mass spectrometry analysis of control and acid phosphatase 5-deficient mice. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 12(7):1806-1817.
18. Lang L, Reitman M, Tang J, Roberts RM, & Kornfeld S (1984) Lysosomal enzyme phosphorylation. Recognition of a protein-dependent determinant allows specific phosphorylation of oligosaccharides present on lysosomal enzymes. *The Journal of biological chemistry* 259(23):14663-14671.
19. Serrano P, Geralt, M., Wuthrich, K. (2015) NMR structure of the 140-315 fragment of the N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits.
20. Velho RV, et al. (2015) Analyses of disease-related *GNPTAB* mutations define a novel GlcNAc-1-phosphotransferase interaction domain and an alternative site-1 protease cleavage site. *Human molecular genetics* 24(12):3497-3505.
21. Steet R, Lee WS, & Kornfeld S (2005) Identification of the minimal lysosomal enzyme recognition domain in cathepsin D. *The Journal of biological chemistry* 280(39):33318-33323.
22. Valenzano KJ, Remmler J, & Lobel P (1995) Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor carries multiple high molecular weight forms of insulin-like growth factor II in fetal bovine serum. *The Journal of biological chemistry* 270(27):16441-16448.
23. Dustin ML, Baranski TJ, Sampath D, & Kornfeld S (1995) A novel mutagenesis strategy identifies distantly spaced amino acid sequences that are required for the phosphorylation of both the oligosaccharides of procathepsin D by N-acetylglucosamine 1-phosphotransferase. *The Journal of biological chemistry* 270(1):170-179.

Ejemplo 5. Procedimiento para producir enzimas lisosomales altamente fosforiladas para terapia de sustitución enzimática.

- La terapia de sustitución enzimática (ERT) es actualmente la principal forma de tratamiento para una serie de enfermedades de almacenamiento lisosómico, aunque su eficacia varía entre los trastornos individuales [1]. La mayoría de estos trastornos hereditarios surgen de la falta de actividad de una sola enzima lisosomal, lo que conduce a la acumulación del material que normalmente es degradado por la enzima. La acumulación del material de almacenamiento en el lisosoma acaba provocando la disfunción de células y órganos. El objetivo de la ERT es introducir cantidades suficientes de enzima normal en los lisosomas de las células defectuosas para eliminar el material de almacenamiento y restaurar la función del lisosoma. Esta forma de terapia se utilizó por primera vez en pacientes con enfermedad de Gaucher de tipo 1 que carecen de actividad de β -glucocerebrosidasa ácida y acumulan glucosilceramida principalmente en células de tipo macrófago [2]. La enzima de sustitución, que contiene glicanos N-ligados con residuos terminales de manosa, se infunde por vía intravenosa y es captada por los macrófagos a través de los receptores de manosa de la superficie celular. La enzima endocitada es entonces transportada vía endosomas a los lisosomas donde funciona con buenos resultados clínicos en este trastorno [3].

Dado que la mayoría de los tipos celulares carecen de receptores de manosa, las enzimas de sustitución utilizadas para tratar los trastornos por almacenamiento lisosómico que afectan a tipos celulares distintos de los macrófagos utilizan la unión a receptores de manosa 6-fosfato (Man-6-P) en la superficie celular para su

posterior transporte a los lisosomas. Estas enzimas se purifican a partir de las secreciones de células de mamíferos, principalmente células de ovario de hámster chino, diseñadas para producir altos niveles de la enzima de interés. Este enfoque depende de la capacidad de la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena para fosforilar los residuos de manosa de los N-glicanos de la enzima lisosomal expresada. Algunas de las enzimas de sustitución producidas por esta técnica están altamente fosforiladas y se unen bien a los receptores Man-6-P. Otras, sin embargo, están poco fosforiladas, lo que limita su eficacia en la ERT. Esto incluye la enzima de la enfermedad de Pompe (α -glucosidasa ácida, GAA) y la enzima de la alfa-manosidosis (α -manosidasa ácida lisosomal, LAMAN) [4, 5].

La actividad de la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena puede ser insuficiente para fosforilar eficazmente los altos niveles de GAA y LAMAN que son sintetizadas por las células productoras. Para examinar esta posibilidad, células D9 L de ratón negativas para Expi293F o para el receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR) fueron co-transfectadas con plásmidos que codificaban una enzima lisosomal de interés junto con el ADNc para el precursor de la GlcNAc-1-fosfotransferasa α/β . Mientras que la GlcNAc-1-fosfotransferasa es un hexámero $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ codificado por dos genes (*GNPTAB* y *GNPTG*), las subunidades α/β son capaces de fosforilar la mayoría de las enzimas lisosomales en ausencia de γ [6]. Además, también se ensayó un precursor α/β truncado (S1-S3) que carece de varios elementos de la subunidad α mientras conserva los dominios catalíticos «Stealth» (FIG. 12A). Esta enzima truncada se expresa a niveles muy altos, lo que resulta en una actividad catalítica 20 veces mayor que la de la enzima WT [7].

La unión de cuatro enzimas lisosomales secretadas por las células transfectadas a las perlas de CI-MPR se muestra en la FIG. 12B. El aumento de la unión, en este caso, refleja un mayor grado de fosforilación de estas enzimas. En todos los casos, la enzima secretada por las células co-transfectadas con el precursor α/β truncado se unió a las perlas de CI-MPR en mucha mayor medida que la observada con la enzima expresada sola en las células. El efecto que tiene la cotransfección con el precursor α/β WT en la unión de la enzima lisosomal a las perlas de CI-MPR fue variable, desde una estimulación mínima de la unión a GAA hasta una unión 12 veces mayor en el caso de LAMAN. Para observar más directamente los efectos de los constructos de precursores α/β en la fosforilación de enzimas lisosomales, se transfectaron células HeLa con un gen *GNPTAB* inactivado por CRISPR-Cas9 [8] con los distintos plásmidos y luego se incubaron con [3 H] manosa durante 1 hora para marcar los glicanos N-ligados de las enzimas lisosomales. Como control, las células HeLa parentales con GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena activa se transfectaron solo con los plásmidos que codificaban las enzimas lisosomales. Tras 4 horas de seguimiento en presencia de NH_4Cl para estimular la secreción de la enzima marcada, se recogió el medio y se inmunoprecipitó la enzima lisosomal de interés. Los inmunoprecipitados se analizaron para determinar su contenido en glicanos N-ligados con alto contenido en manosa con uno o dos residuos de Man-6-P [8, 9]. Estos experimentos mostraron que el precursor α/β truncado estimulaba la fosforilación de manosa a varios niveles sobre las células HeLa parentales, dependiendo de la enzima lisosomal (FIG. 12C). Además, la enzima truncada aumentó la formación de glicanos con dos residuos Man-6-P (Tabla 2). Esto es importante ya que los glicanos con 2 residuos Man-6-P se enlazan con mucha mayor afinidad a la CI-MPR que los glicanos con solo 1 residuo de Man-6-P [10]. El precursor WT α/β también estimuló la formación de Man-6-P, pero en menor medida que la observada con el mutante α/β .

En la Tabla 1 se muestra el impacto que tiene el aumento del contenido de Man-6-P de las diversas enzimas lisosomales en su captación por las células HeLa. Con la excepción de GAA, las enzimas secretadas por células co-transfectadas con plásmidos que codifican precursor WT o precursor α/β truncado fueron internalizadas muchas veces mejor que la enzima secretada por células que utilizan solo la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. La mayor parte de la absorción fue bloqueada por la presencia de 5mM de Man-6P en el medio, lo que demuestra que la absorción está mediada por el receptor de Man-6-P. Los resultados con LAMAN fueron especialmente sorprendentes, ya que la captación capaz de inhibirse por Man-6-P se estimuló entre 130 y 153 veces. En el caso de GAA, la captación dependiente de Man-6-P de la enzima secretada por células cotransfectadas con el precursor α/β truncado fue 2.6 veces mayor que la de GAA secretada por células cotransfectadas con el precursor WT α/β o que solo expresaban la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena.

Estos hallazgos establecen que la fosforilación de enzimas lisosomales puede incrementarse sustancialmente mediante la cotransfección con precursor WT o α/β truncado de GlcNAc-1-fosfotransferasa. La fosforilación aumentada incrementa la unión al CI-MPR y la captación por las células. Este efecto se produce incluso con enzimas lisosomales como GalA, que están bien fosforiladas por la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. Pero lo más importante es el hallazgo de que este procedimiento mejora la fosforilación y captación de LAMAN y GAA, dos enzimas lisosomales que son poco fosforiladas por la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena. Las enzimas preparadas por este procedimiento tienen el potencial de mejorar significativamente su utilidad en ERT. Además de proporcionar una mejor captación celular, estas preparaciones pueden permitir la administración de dosis más bajas a los pacientes, quizás a intervalos menos frecuentes. El procedimiento debería ser aplicable a la producción de enzimas lisosomales para otras enfermedades de almacenamiento lisosomal que puedan ser susceptibles de ERT. Además, la producción de GBA que contiene altos niveles de Man-6-P ofrece la oportunidad de restaurar la actividad enzimática en tipos de células de pacientes con enfermedad de Gaucher que carecen del receptor de manosa. Esto podría servir para proporcionar un beneficio adicional a la terapia actual que se dirige específicamente a los macrófagos.

Procedimientos para el Ejemplo 5.

Líneas celulares - Las células Expi293F son de Life Technologies. Estas células se cultivaron en suspensión en medio de expresión Expi293 (Life Technologies). La línea celular *GNPTAB*^{-/-} HeLa se ha descrito en detalle en otro lugar [8]. Las células HeLa parentales y *GNPTAB*^{-/-} se mantuvieron como una monocapa en DMEM (Life Technologies) que contenía 0.11 g/L de piruvato sódico y 4.5 g/L de glucosa, suplementado con un 10% (vol/vol) de FBS (Atlanta Biologicals), 100,000 U/L de penicilina, 100 mg/L de estreptomina (Life Technologies) y 2 mM de L-glutamina (Life Technologies). Las células L de ratón CI-MPR negativas (línea celular D9) han sido descritas [11]. Las células D9 se mantuvieron como una monocapa en α -MEM (Life Technologies) con 100,000 U/L de penicilina y 100 mg/L de estreptomina (Life Technologies).

Constructos de ADN - *GNPTAB*-V5/His humano y el mutante de delección S1-S3 en pcADN6 han sido descritos [7]. El ADNc de LAMAN-myc-Flag se compró a Origene, mientras que el ADNc de GAA fue un amable regalo de Eline van Meel (Universidad de Leiden, Países Bajos). Los ADNc de GBA y GLA fueron generosamente proporcionados por Amicus Therapeutics.

Cromatografía de afinidad de CI-MPR y ensayos enzimáticos - La CI-MPR bovina soluble se purificó a partir de suero bovino fetal y se conjugó covalentemente con Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma-Aldrich) como se ha descrito [12]. Los medios procedentes de células Expi293F transfectadas durante 2 días o de células D9 de ratón se incubaron con las perlas de CI-MPR a 4°C durante 1 h para unir las enzimas lisosomales fosforiladas. A continuación, se sedimentaron las perlas, se lavaron con regulador (25 mM Tris-Cl, pH 7.2, 150 mM NaCl y 1% Triton-X 100) y se ensayó la actividad de las enzimas lisosomales tal y como se ha descrito [13]. Se calculó la cantidad de enzima inicial recuperada en las perlas.

Captación celular de enzimas lisosomales - Las células HeLa parentales se sembraron en una placa de 12 pocillos a una densidad de alrededor del 80% un día antes del experimento de captación celular. El medio que contenía cada enzima proveniente de las células productoras se añadió a las células HeLa parentales en un volumen final de 500 μ l. Para los experimentos de competición, se añadió Man-6-P a una concentración final de 5 mM. Las células se incubaron durante 24 h más, tras lo cual se recogieron por separado los medios y las células. Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se lisaron en Tris-Cl de 25 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, Triton-X 100 al 1% y cóctel inhibidor de proteasas (Life Technologies). Los medios y las células lisadas se centrifugaron a 20,000 $\times$ g, y se ensayó la actividad de la enzima en el sobrenadante de los medios y el lisado celular.

Experimentos de etiquetado de [2-³H]manosa para enzimas lisosomales - Se realizaron experimentos de etiquetado con células HeLa parentales *GNPTAB*^{-/-} transfectadas de la siguiente manera: 48 h después de la transfección, las células en placas de cultivo tisular de 60 mm se incubaron con 50-150 μ Ci de [2-³H]manosa (Perkin Elmer) durante 2 h, seguido de la adición de medio completo que contenía 5 mM de glucosa, 5 mM de manosa y 10 mM de NH₄Cl para detener la captación de manosa e inducir la secreción. Las células se incubaron durante otras 3 h antes de recoger el medio para el análisis.

Inmunoprecipitación y análisis de oligosacáridos - Las hidrolasas ácidas secretadas en el medio fueron inmunoprecipitadas, y los oligosacáridos aislados y analizados esencialmente como se describió en detalle anteriormente [9]. Dado que los cADNs de LAMAN, GAA y GBA tenían una etiqueta myc, se enlazaron previamente 20 μ l de anticuerpo monoclonal anti-myc (Santa Cruz Biotechnology) a 100 μ l de perlas de proteína G-agarosa-PLUS (Santa Cruz Biotechnology) antes de la inmunoprecipitación de las hidrolasas lisosomales marcadas de los medios. En el caso de GLA, la enzima secretada se inmunoprecipitó con perlas de proteína G-agarosa-PLUS enlazadas previamente a un anticuerpo anti- β -Gal (Amicus Therapeutics). El material inmunoprecipitado se trató con Endo H (NEB) y se filtró con Ultracel-10K (EMD Millipore). El filtrado que contenía glicanos de alta manosa neutros y fosforilados se trató con ácido suave para eliminar cualquier residuo de N-acetilglucosamina todavía unido a las fracciones de fosfato y se aplicó a una matriz de columna QAE para separar los oligosacáridos que portan cero, uno o dos residuos de Man-6-P. El retenido que contenía oligosacáridos complejos resistentes a Endo H se trató con Pronase (Roche Diagnostics) y se fraccionó en ConA-sepharose 4B (GE Healthcare). Se determinó el contenido de [2-³H]-manosa de cada fracción y se calculó el porcentaje de fosforilación como se ha descrito [9].

Tabla 1. Captación celular de enzimas lisosomales fosforiladas con GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena o enzima WT sobreexpresada o el mutante S1-S3. Los experimentos de captación se realizaron en ausencia de Man-6-P o con 5 mM de Man-6-P para inhibir competitivamente la captación de las enzimas fosforiladas.

Enzima	PTasa	Total U agregado	Man-6-P	% de absorción*		Aumento de multiplicación
				Dependiente de M6PR		
LAMAN	Endógena	670	-	0.76 ± 0.23	014	
			+	0.62 ±0.27		

	WT _{α/β}	359	-	24.70 ± 1.34	215	153x
			+	320 ± 0.77		
	S1-S3	530	-	22.46 ± 4.07	182	130X
			+	4.3 ± 1.19		
	Endógena	5.7	-	4.05 ± 0.46	3.8	
			+	0.22 ± 0.42		
GAA	WT _{α/β}	3.8	-	3.31 ± 1.13	2.9	0.8X
			+	0.44 ± 1.16		
	S1-S3	32	-	12.79 ± 0.90	9.8	2.6X
			+	239 ± 1.59		
	Endógena	2.7	-	10.74 ± 1.94	5.1	
			+	5.65 ± 1.51		
GBA	WT _{α/β}	2.3	-	46.73 ± 4.00	37.4	7,3X
			+	9.37 ± 1.26		
	S1-S3	2.8	-	49.74 ± 11.53	41.1	8.0X
			+	8.67 ± 4.21		
	Endógena	194	-	2.72 ± 0.91	17	
			+	1.00 ± 0.11		
GLA	WT _{α/β}	141	-	9.53 ± 0.11	8.2	4.8X
			+	1.30 ± 0.13		
	S1-S3	237	-	7.01 ± 0.69	6.1	3.5X
			+	0.95 ± 0.11		

Nota: 1 U = 1 nmol de 4-metilumbeliferona liberado por hora

± % de absorción por 200 ug de proteína celular en 24 horas

Tabla 2. Distribución de glicanos de alta manosa con uno o dos residuos Man-6-P presentes en enzimas lisosomales. Los datos presentados en la FIG. 12C se desglosan aún más para mostrar el contenido de glicanos con 1 o 2 residuos Man-6-P entre las enzimas lisosomales sobre las que actúa la GlcNAc-1-fosfotransferasa endógena o el precursor WT α/β sobreexpresado o el mutante de delección S1-S3.

Enzima	% de fosforilación de oligosacáridos			
	PTasa	HM + 1PM	HM + 2PM	Total
LAMANA	Endógena	4.5	1.0	55
	WT	9.7	3.4	13.1
	S1-S3	24.3	23.9	48.2
GAA	WT	42	1.1	52
	S1-S3	8.3	2.7	11.0

GBA	WT	6.4	12	76
	S1-S3	272	9.7	369
GLA	WT	237	4.0	27.8
	S1-S3	496	12.4	62.0
HM - Oligosacárido con alto contenido de manosa				
PM - fosfomonoéster				

Referencias para el ejemplo 5.

1. Lachmann, R.H., Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Curr Opin Pediatr*, 2011. 23(6): p. 588-93.
- 5 2. Barton, N.W., et al., Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med*, 1991. 324(21): p. 1464-70.
3. Weinreb, N.J., et al., Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment. *J Inher Metab Dis*, 2013. 36(3): p. 543-53.
- 10 4. McVie-Wylie, A.J., et al., Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid alpha-glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe disease. *Mol Genet Metab*, 2008. 94(4): p. 448-55.
5. Roces, D. P., et al., Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice: a preclinical animal study. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(18): p. 1979-88.
- 15 6. Qian, Y., et al., Functions of the alpha, beta, and gamma subunits of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, 2010. 285(5): p. 3360-70.
7. Lin Liu, W.-S.L., Balraj Doray, and Stuart Kornfeld, Regulation of Lysosomal Enzyme Phosphorylation: Role of the Spacer-1 Domain of GlcNAc-1-Phosphotransferase. manuscript in preparation.
8. van Meel, E., et al., Multiple Domains of GlcNAc-1-phosphotransferase Mediate Recognition of Lysosomal Enzymes. *J Biol Chem*, 2016. 291(15): p. 8295-307.
- 20 9. Dustin, M.L., et al., A novel mutagenesis strategy identifies distantly spaced amino acid sequences that are required for the phosphorylation of both the oligosaccharides of procathepsin D by N-acetylglucosamine 1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, 1995. 270(1): p. 170-9.
10. Tong, P.Y., W. Gregory, and S. Kornfeld, Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J Biol Chem*, 1989. 264(14): p. 7962-9.
- 25 11. Gabel, C.A. and S.A. Foster, Lysosomal enzyme trafficking in mannose 6-phosphate receptor-positive mouse L-cells: demonstration of a steady state accumulation of phosphorylated acid hydrolases. *J Cell Biol*, 1986. 102(3): p. 943-50.
12. Valenzano, K.J., J. Remmler, and P. Lobel, Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor carries multiple high molecular weight forms of insulin-like growth factor II in fetal bovine serum. *J Biol Chem*, 1995. 270(27): p. 16441-8.
- 30 13. Qian, Y., et al., Analysis of Mucopolidosis II/III *GNPTAB* Missense Mutations Identifies Domains of UDP-GlcNAc:lysosomal Enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase Involved in Catalytic Function and Lysosomal Enzyme Recognition. *J Biol Chem*, 2015. 290(5): p. 3045-56.

35

REIVINDICACIONES

1. Una subunidad α/β de GlcNAc-1-fosfotransferasa (GlcNAc-1-PT) modificada que comprende la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT humana de longitud completa con dos delecciones internas del aminoácido 86 al 322 y del aminoácido 438 al 928 de la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT humana de longitud completa que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, en la que la subunidad α/β de GlcNAc-1-PT humana de longitud completa tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1.
2. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica la subunidad α/β de (GlcNAc-1-PT) modificada de la reivindicación 1.
3. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 2, en el que la célula huésped está diseñada para producir altos niveles de una proteína de interés.
4. La célula huésped de la reivindicación 3, en la que la proteína de interés es una proteína lisosomal seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en β -glucocerebrosidasa (GBA), GaIA, Cathepsina D (CathD), enfermedad de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2), β -hexosaminidasa (HEXB), α -galactosidasa (GLA), β -manosidasa (MANBA), alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, α -glucosidasa ácida (GAA) y α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN).
5. La célula huésped de la reivindicación 3, en la que la proteína de interés es una proteína no lisosomal seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en DNasa1, renina, factor inhibidor de leucemia (LIF), proteína O-fucosiltransferasa 2 (PoFUT2), glicopepsinógeno (GP), y los dominios AIA2A3 del factor de von Willebrand.
6. La célula huésped de la reivindicación 4, en la que la proteína de interés es α -glucosidasa ácida (GAA) o α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN).
7. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la fosforilación de oligosacáridos de una proteína de interés, el procedimiento comprende expresar una subunidad α/β de GlcNAc-1-PT modificada exógena de la reivindicación 1 en una célula.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la proteína de interés es una proteína lisosomal seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en β -glucocerebrosidasa (GBA), GaIA, Cathepsina D (CathD), enfermedad de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2), β -hexosaminidasa (HEXB), α -galactosidasa (GLA), β -manosidasa (MANBA), alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, arilsulfatasa B, α -glucosidasa ácida (GAA) y α -manosidasa ácida lisosomal (LAMAN).

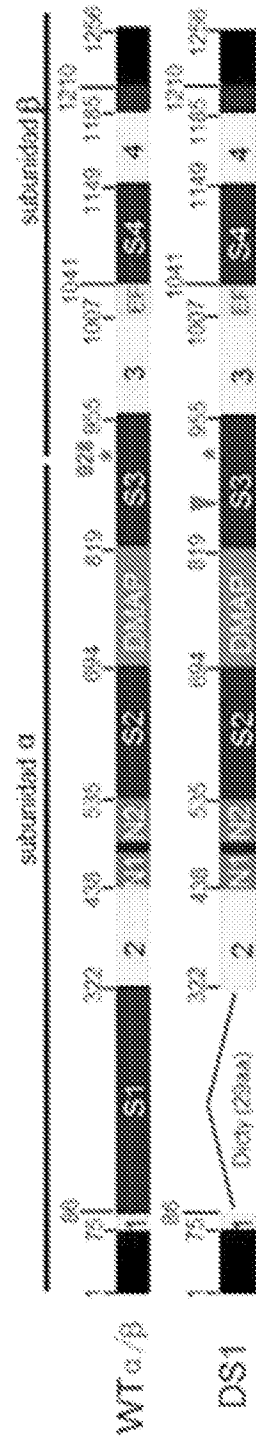


FIG. 1A

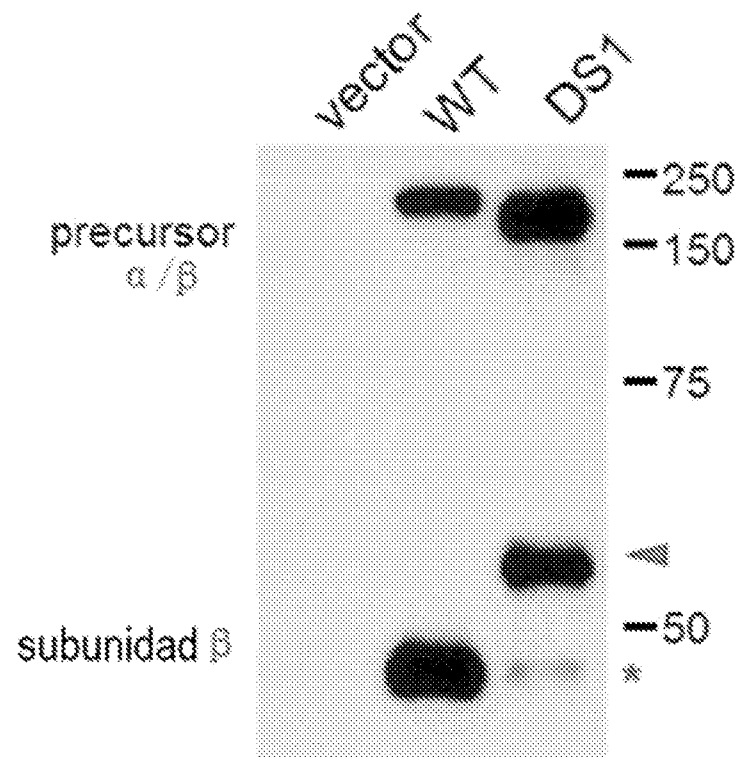


FIG. 1B

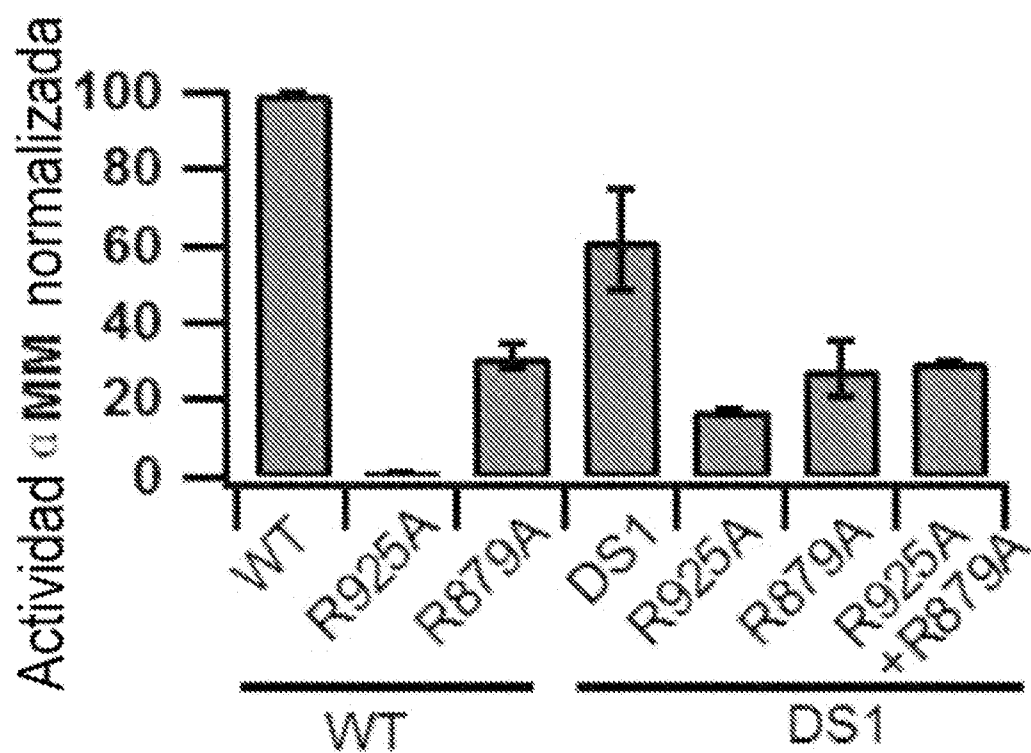


FIG. 1C

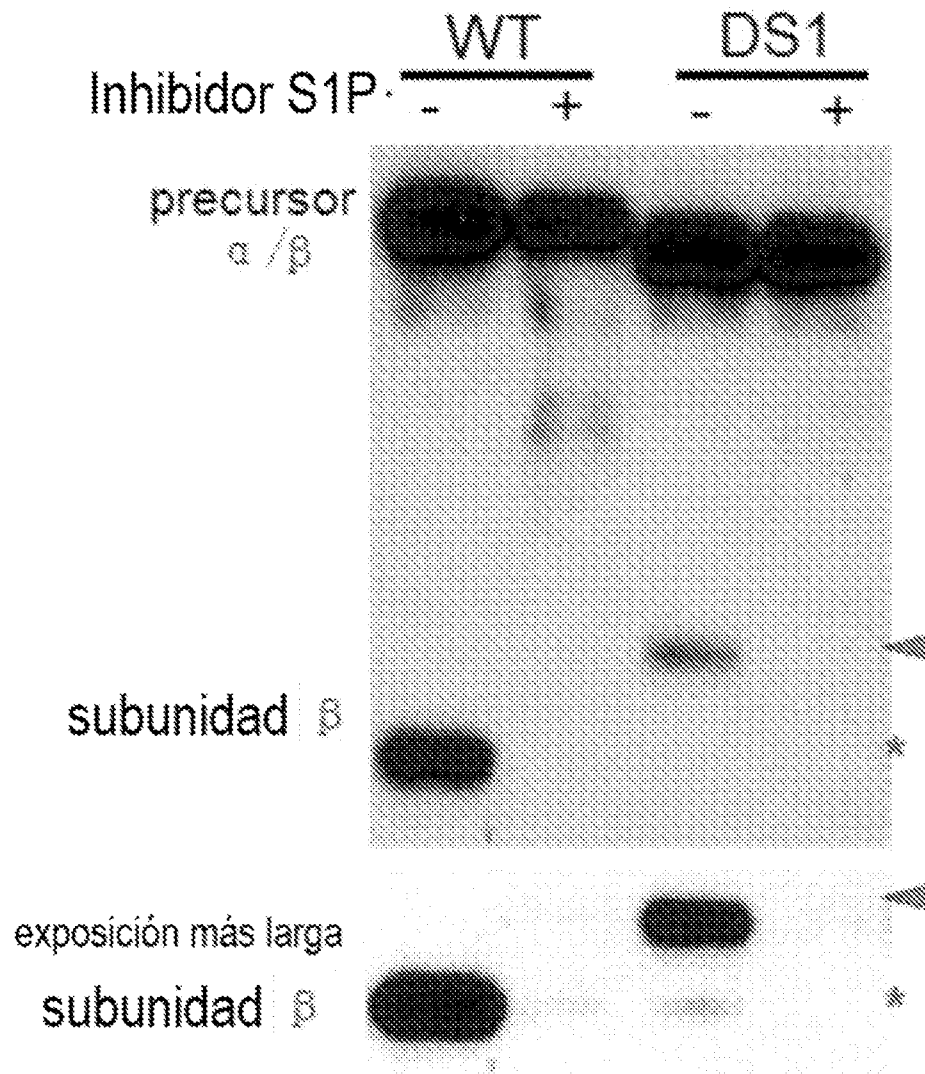


FIG. 1D

Precursor	Secuencia de sitio de escisión								
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	
Pro-BDNF	G	S	R	G	L	T	S	L	
ATF6	Q	R	R	H	L	L	G	F	
SREBP-1a	P	G	R	N	V	L	G	T	
ProS1P sitio B	V	F	R	S	L	K	Y	A	
GNPTAB-928	T	G	R	Q	L	K	D	T	
GNPTAB-882	L	G	R	K	L	Q	H	Y	

FIG. 1E

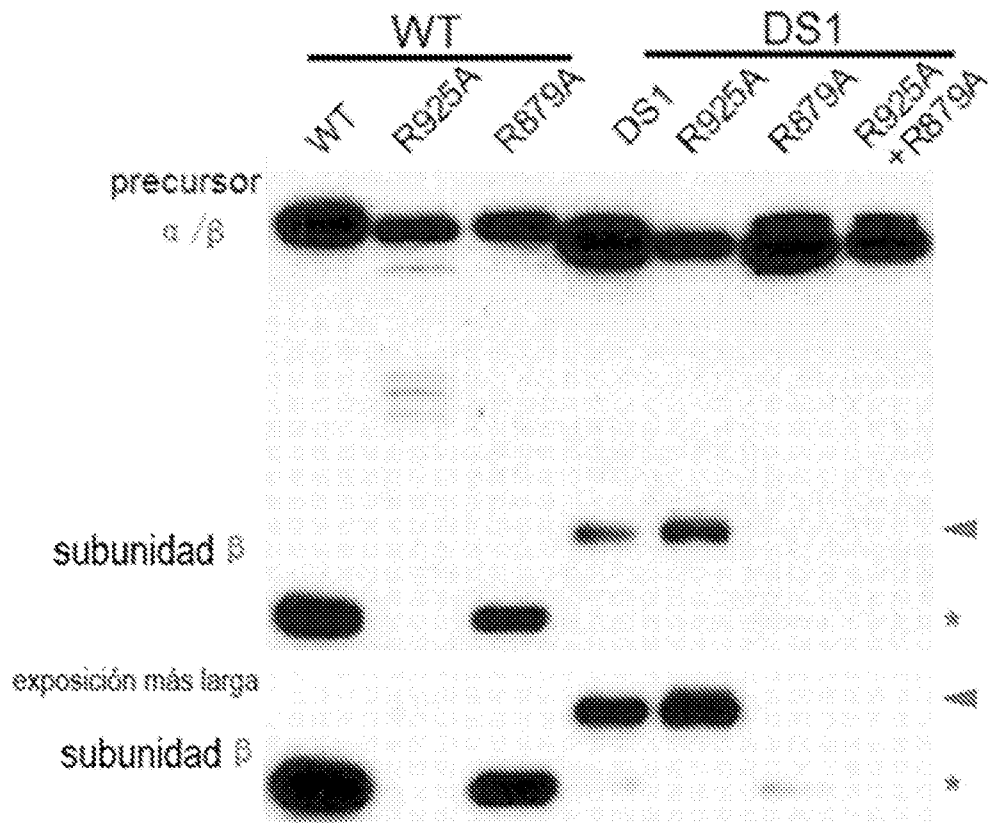


FIG. 1F

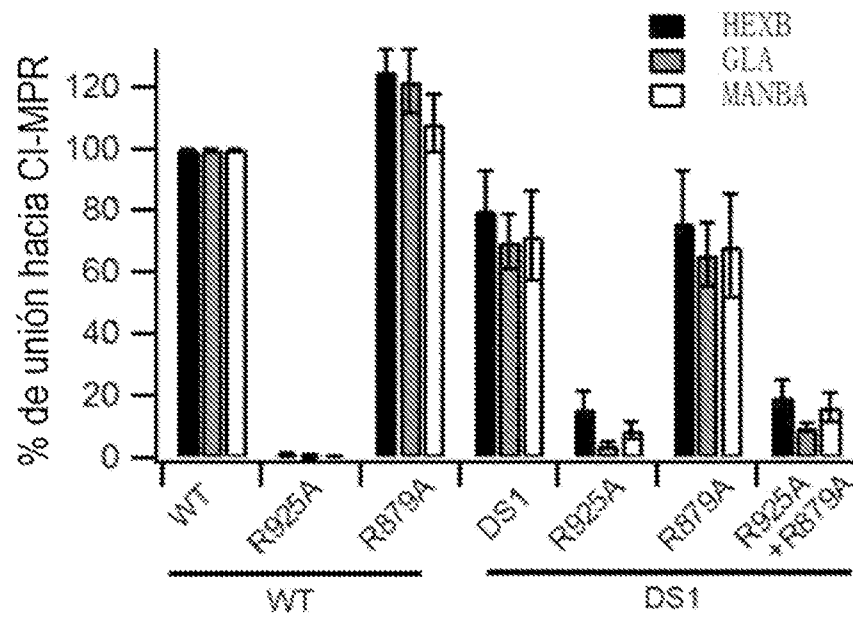
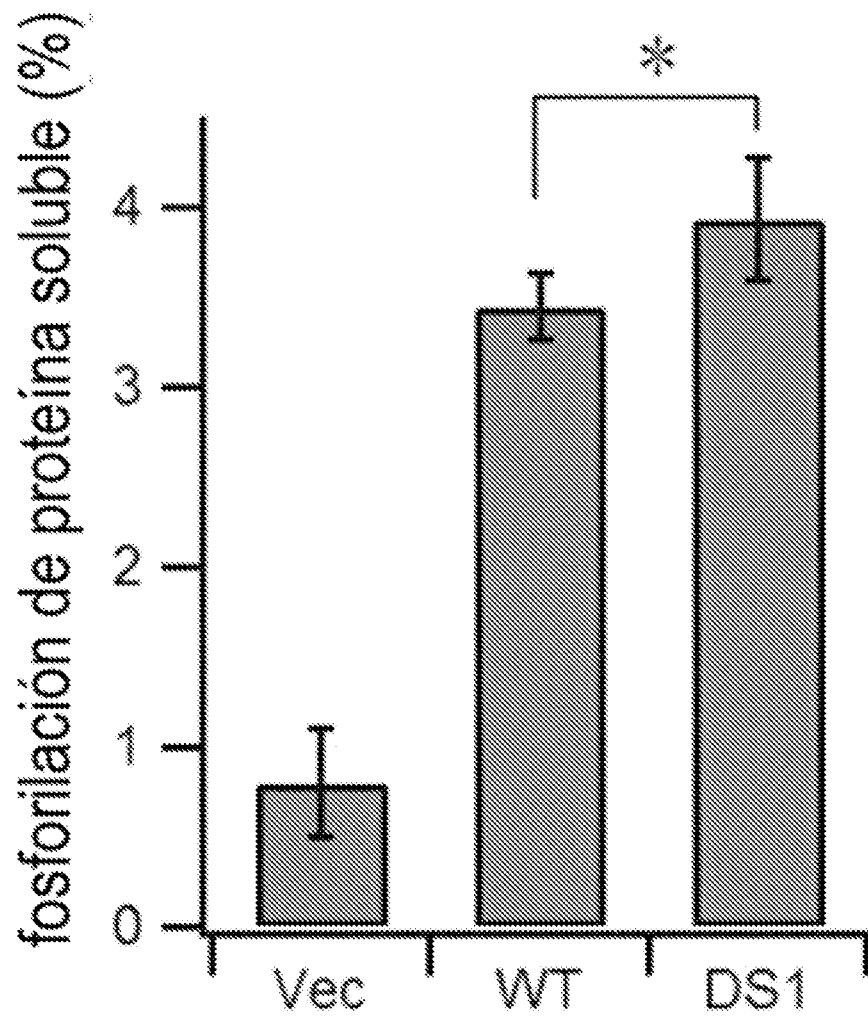
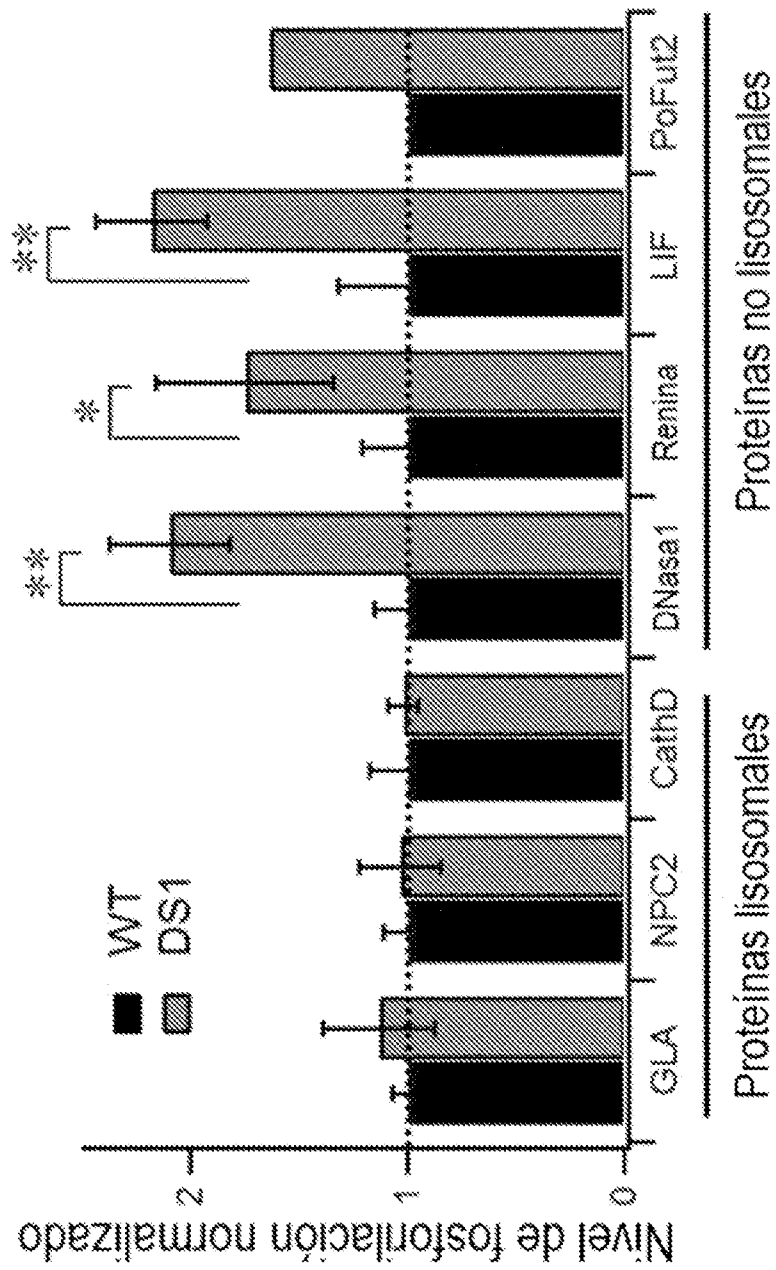


FIG. 1G

**FIG. 2A**

**FIG. 2B**

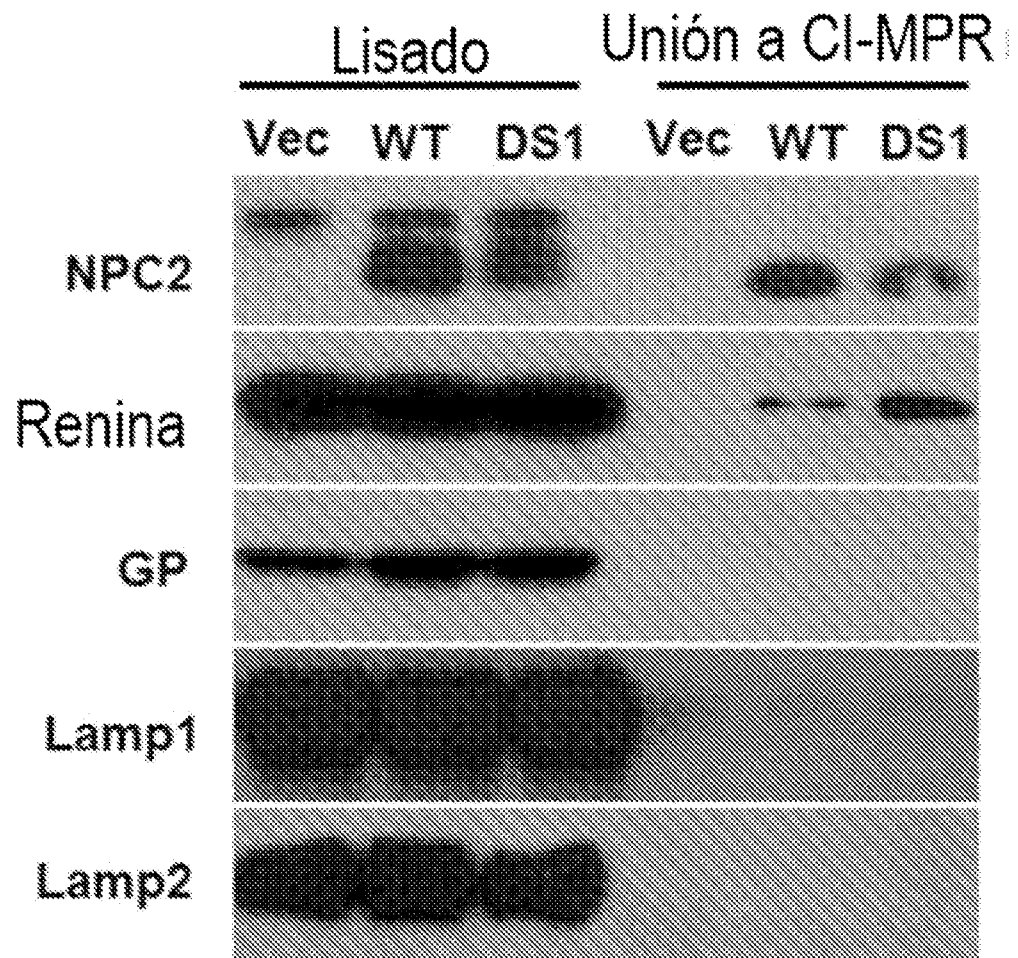


FIG. 2C

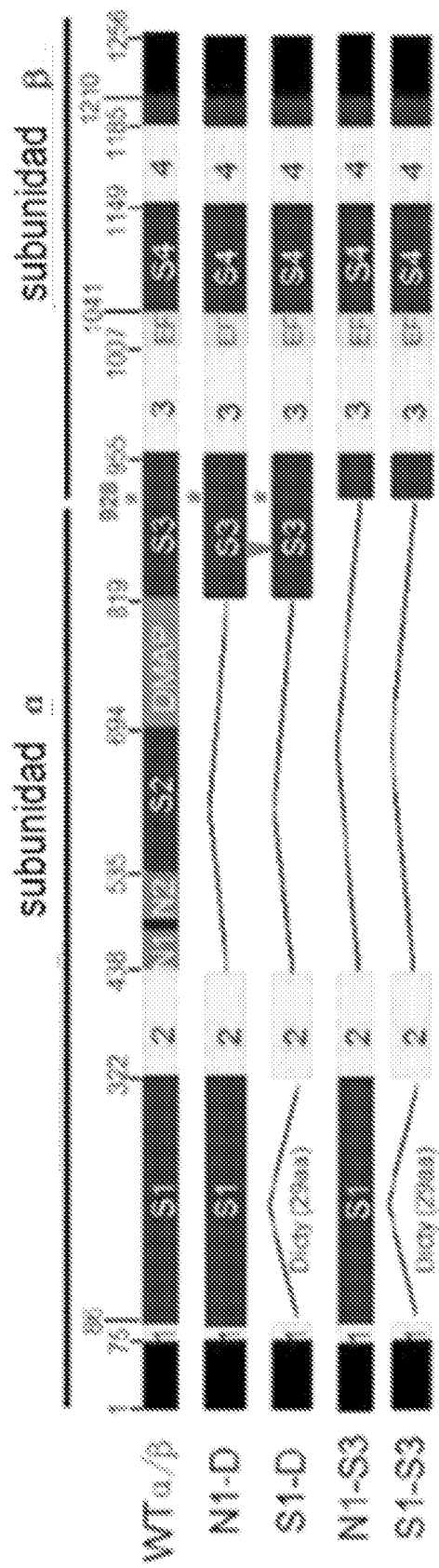
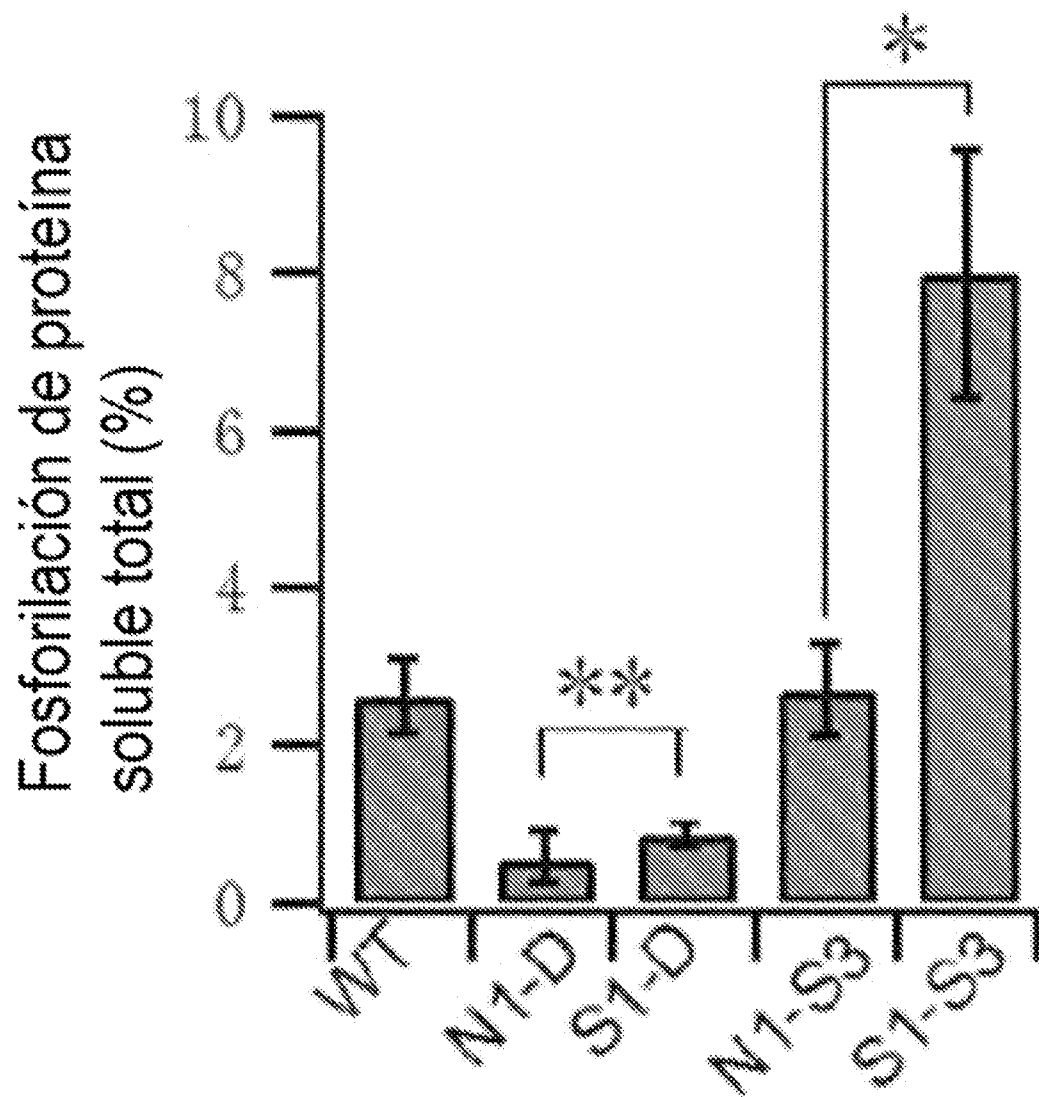
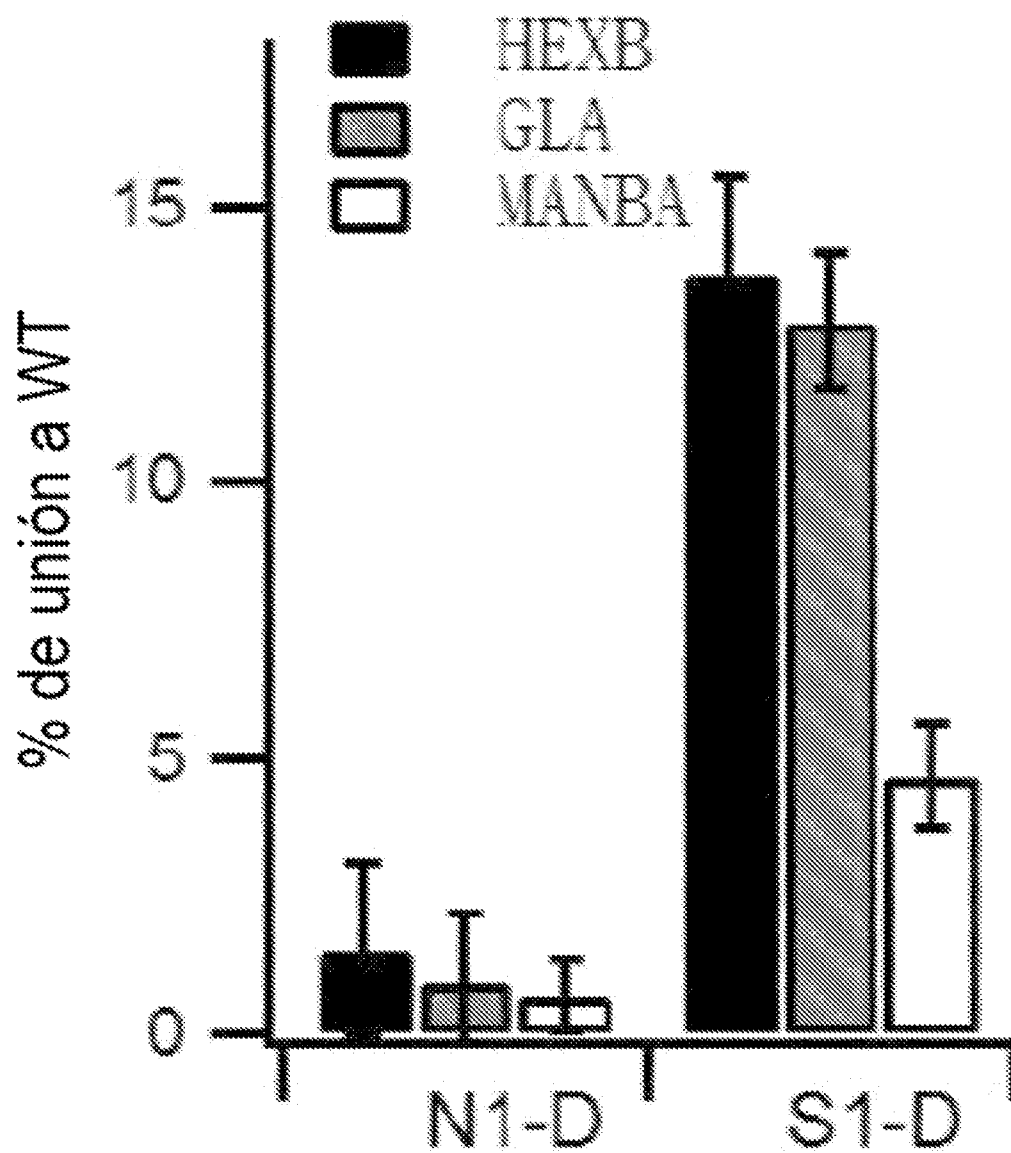


FIG. 3A

**FIG. 3B**

**FIG. 3C**

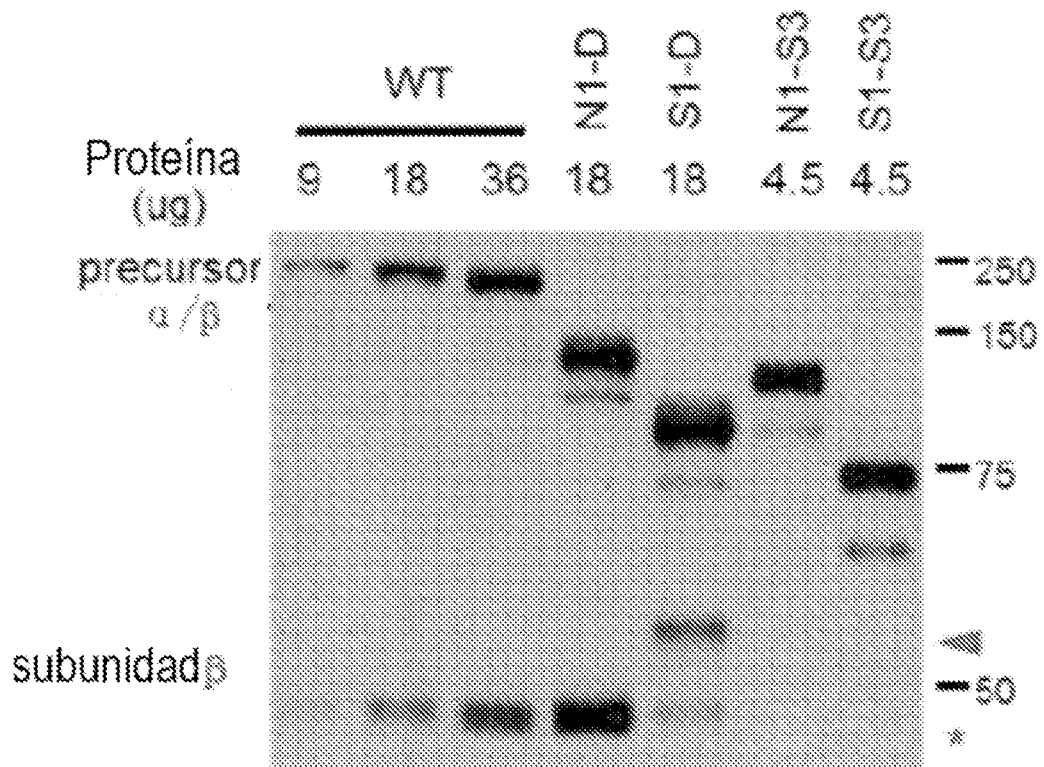
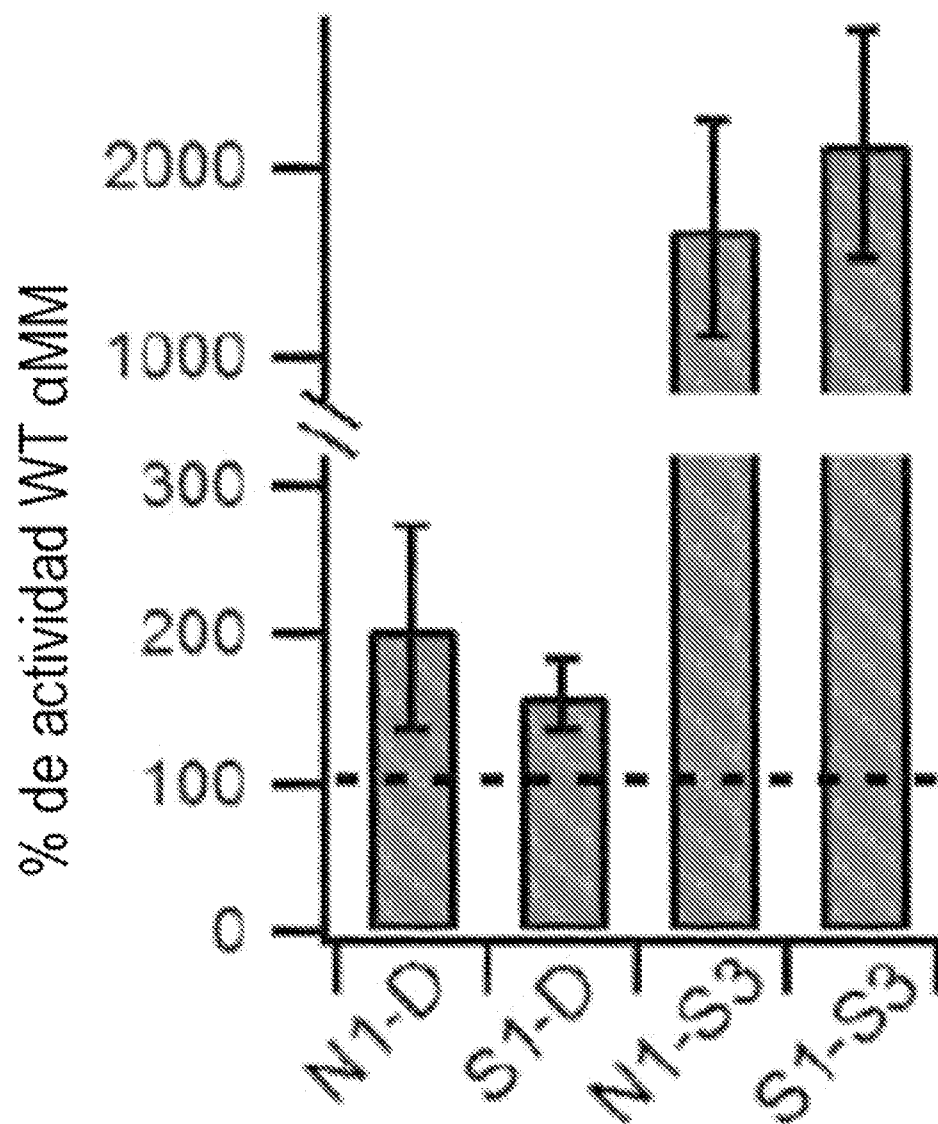


FIG. 3D

**FIG. 3E**

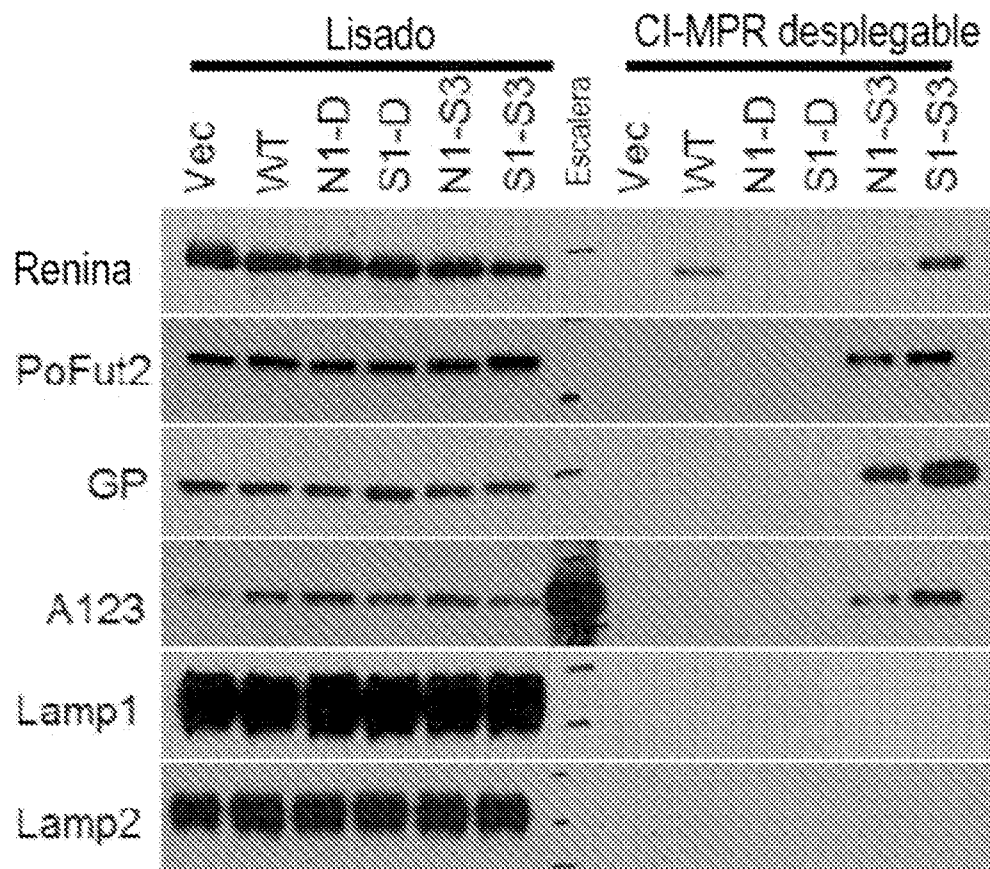
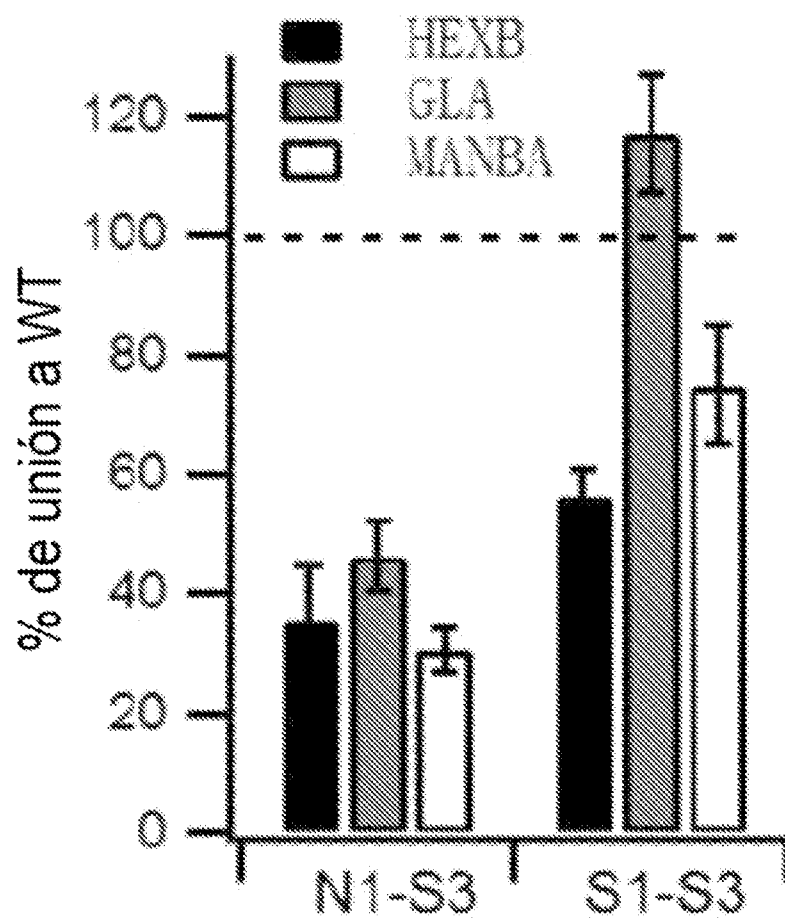


FIG. 3F

**FIG. 3G**

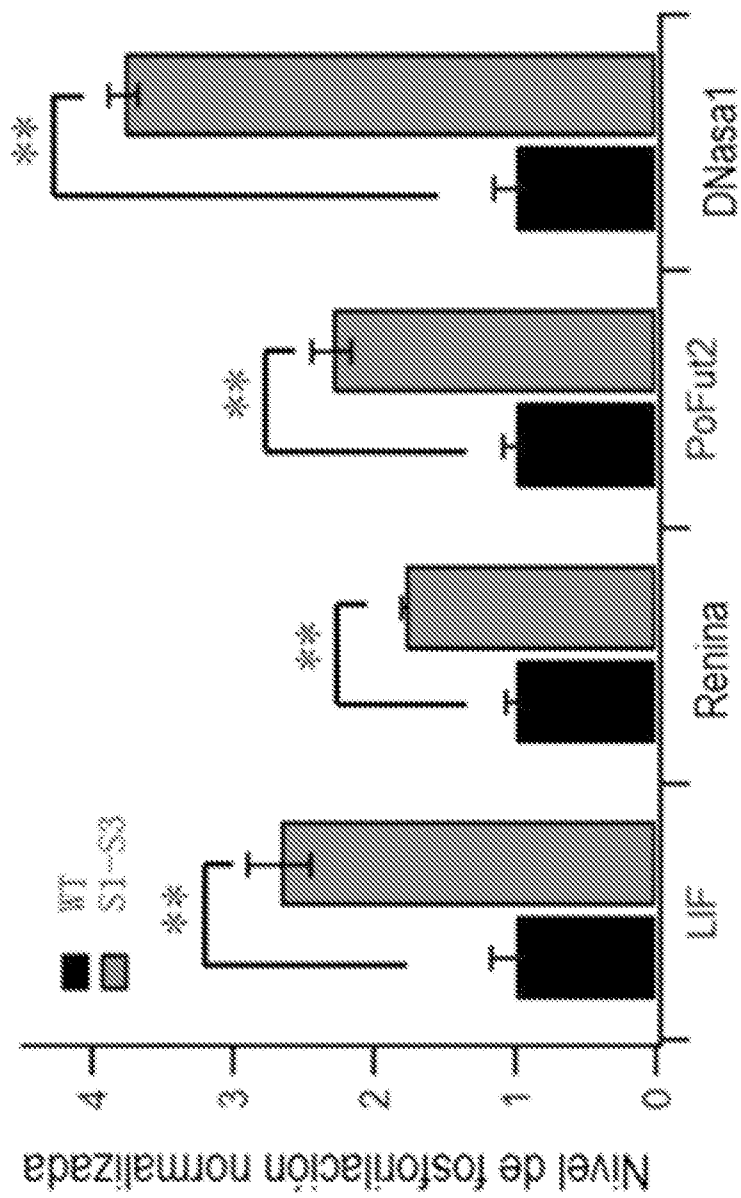


FIG. 4

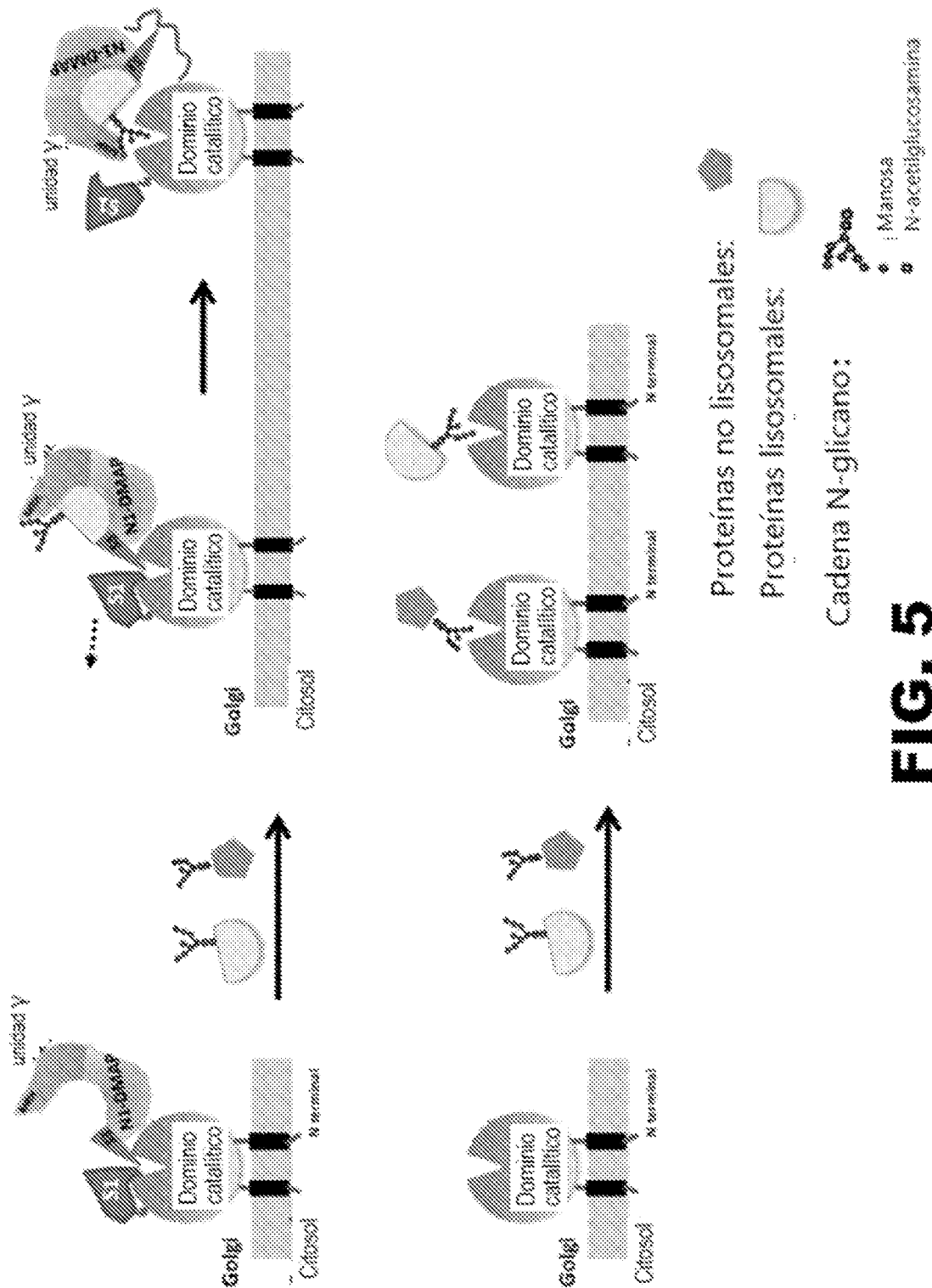


FIG. 5

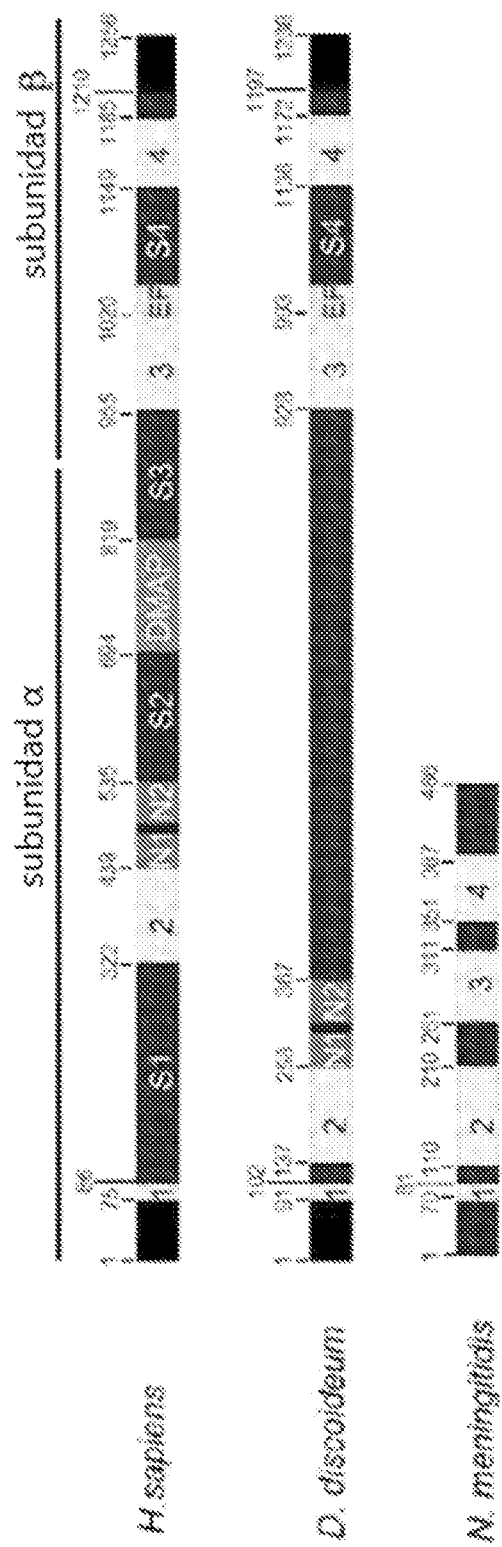


FIG. 6

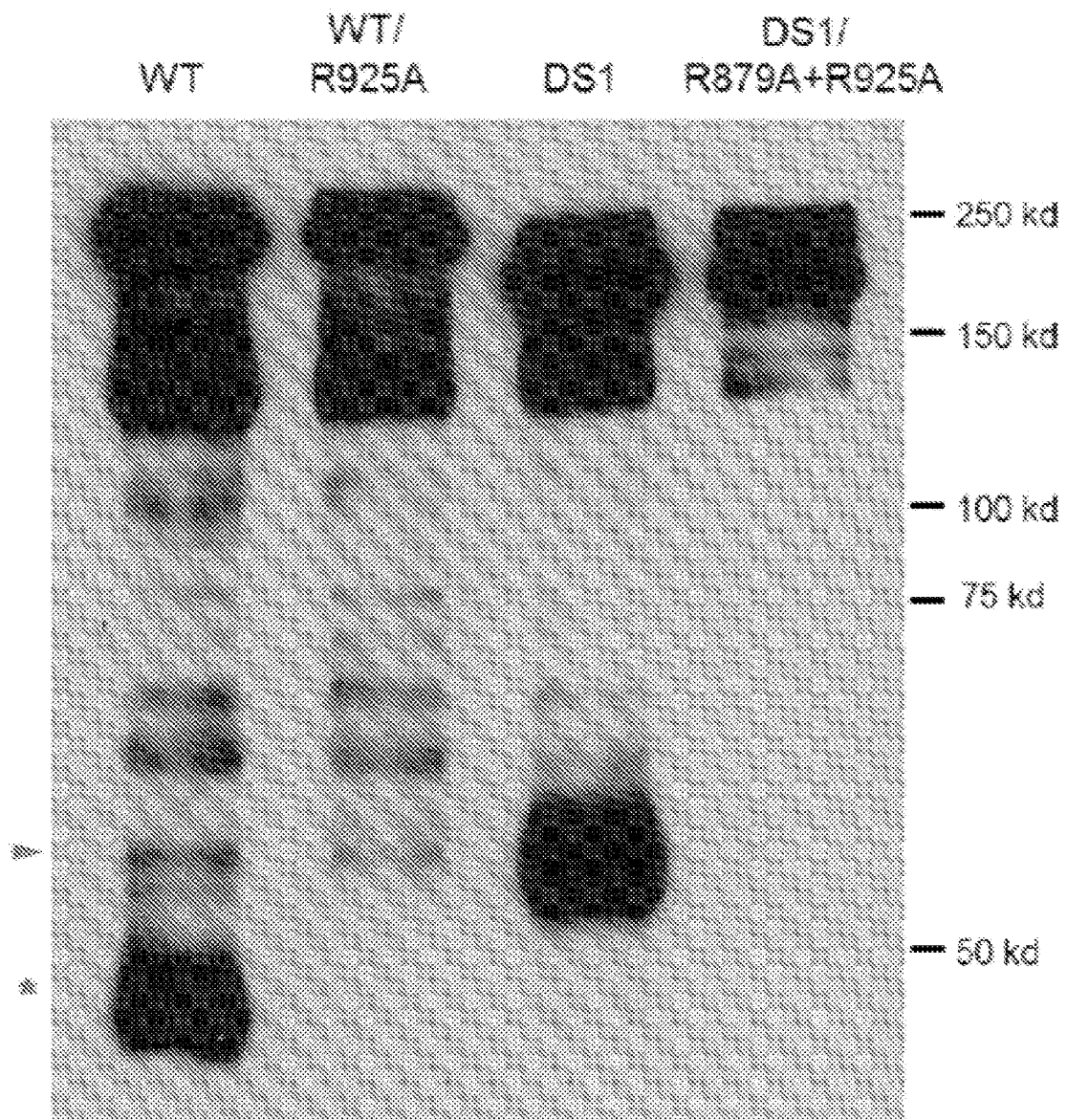


FIG. 7

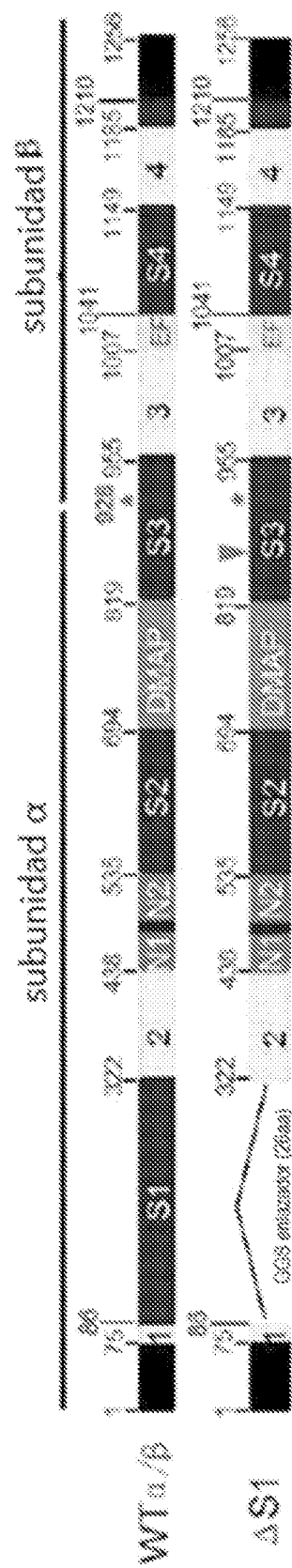


FIG. 8A

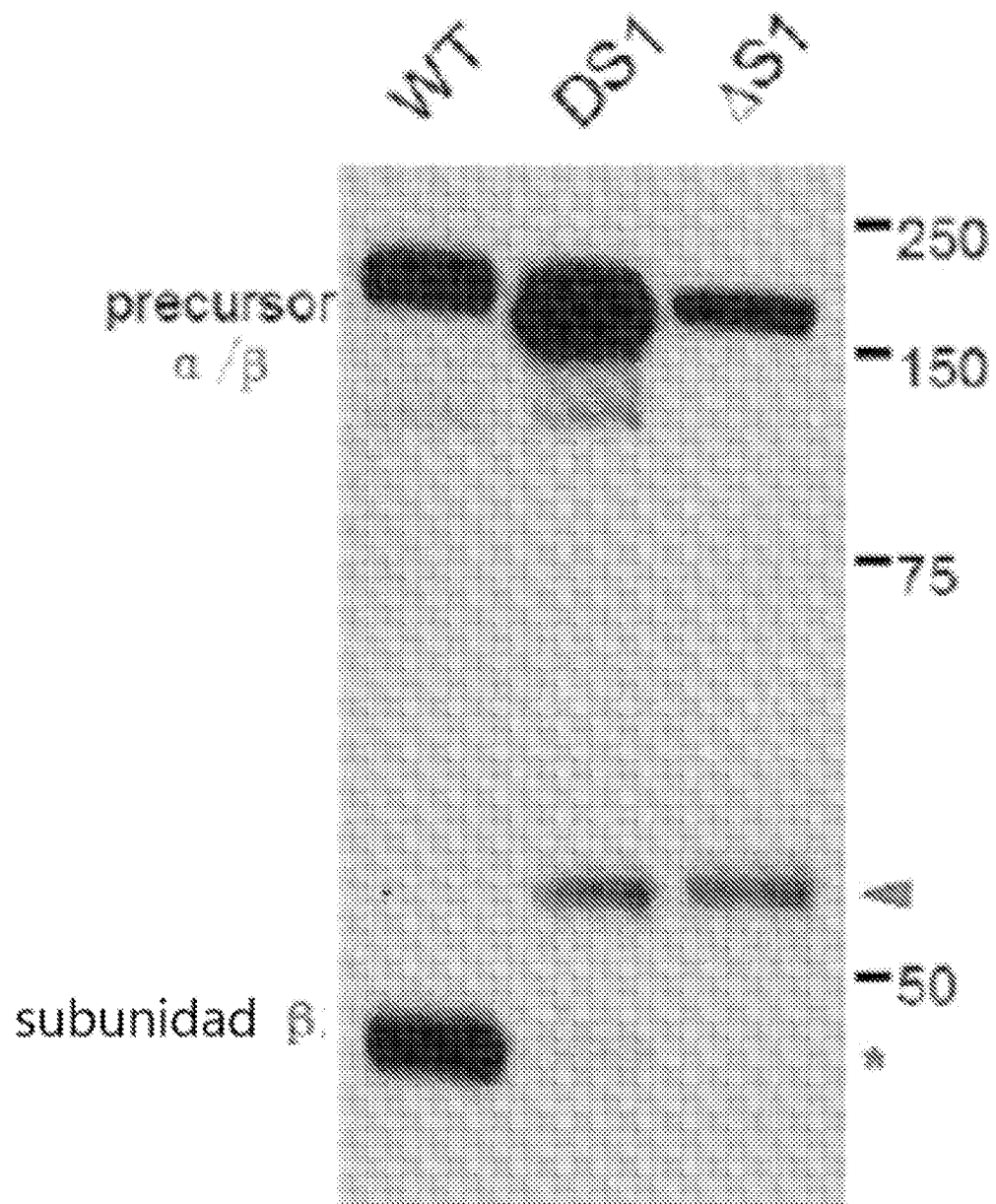


FIG. 8B

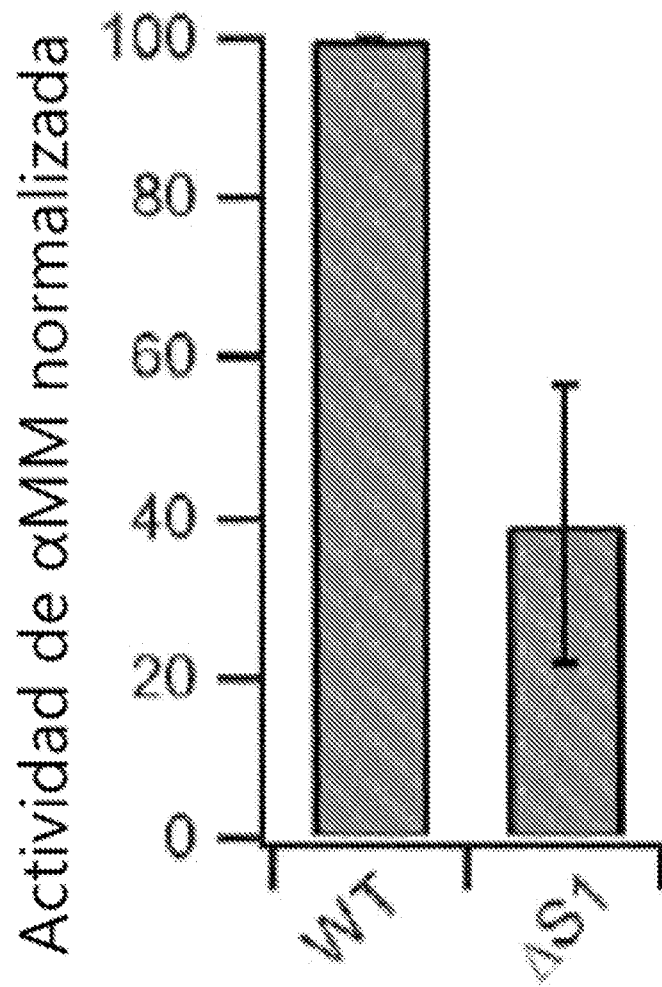


FIG. 8C

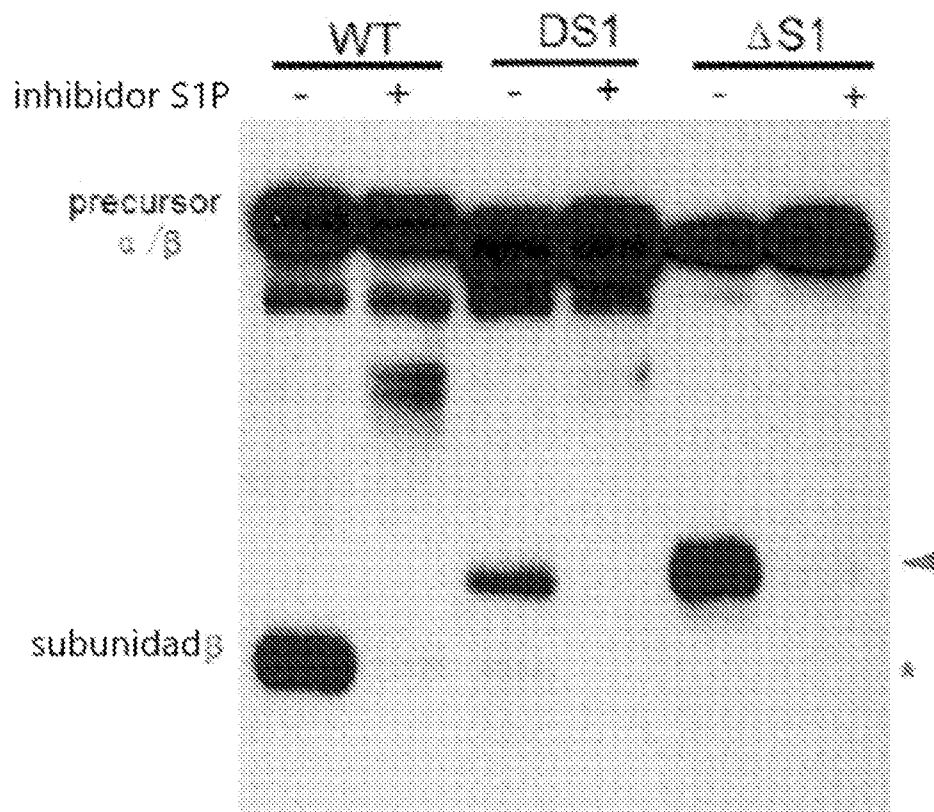


FIG. 8D

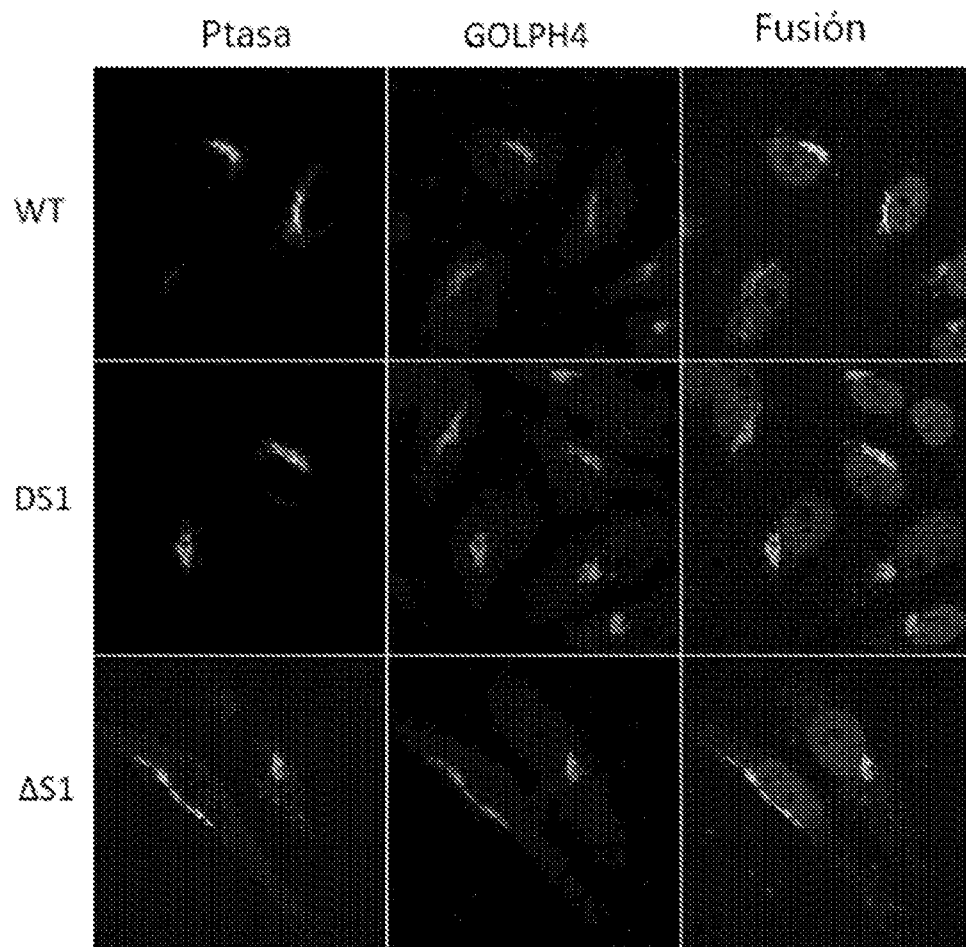


FIG. 9

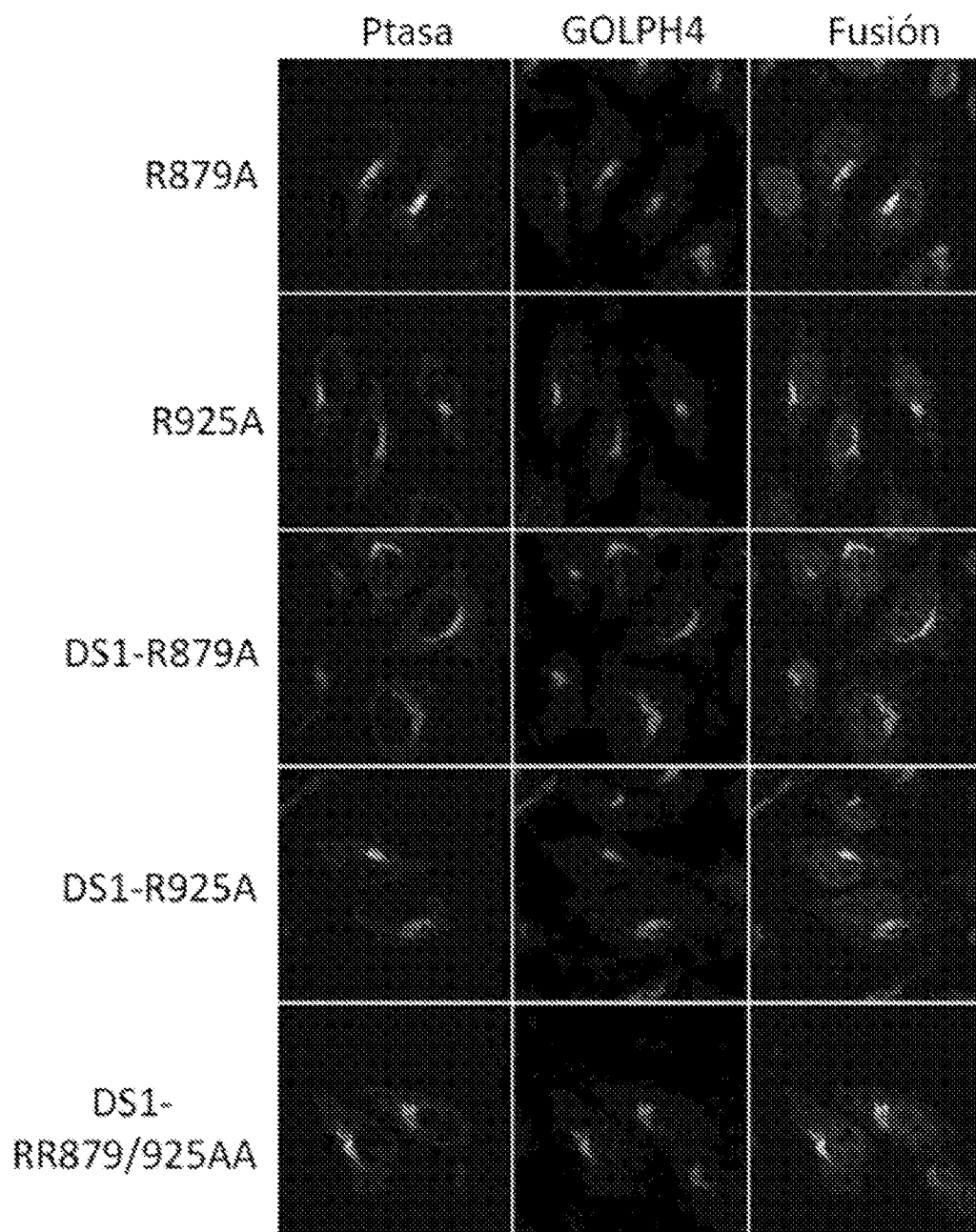


FIG. 10

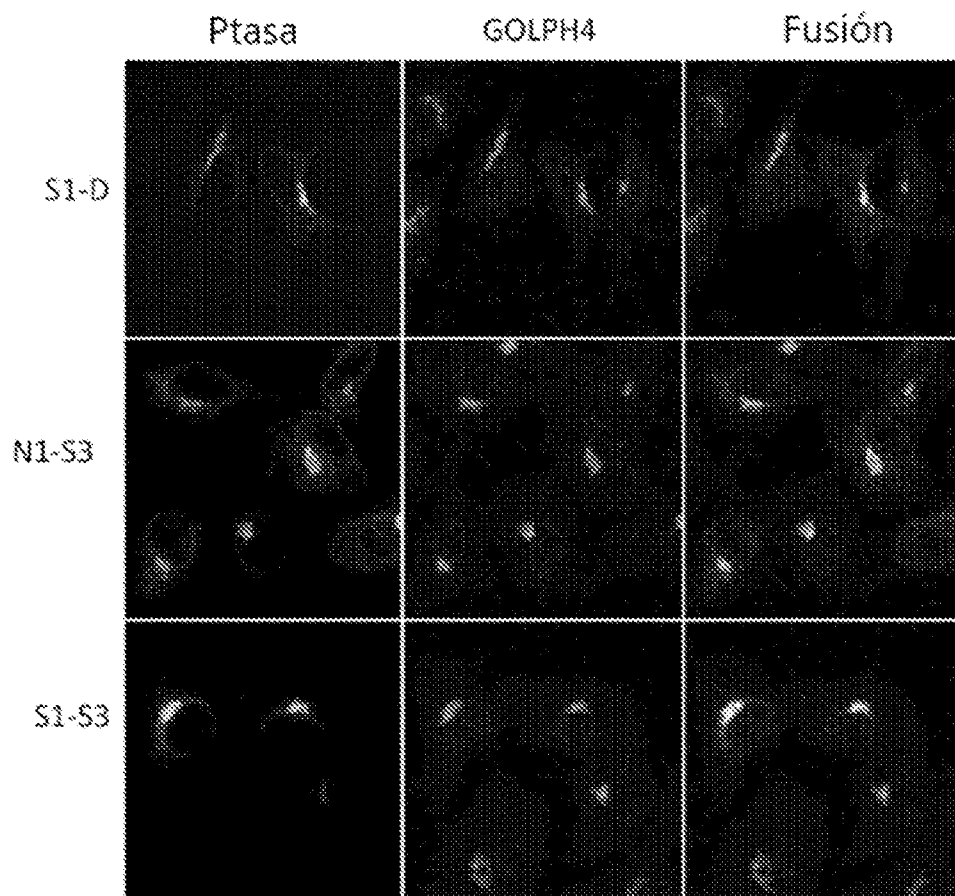


FIG. 11

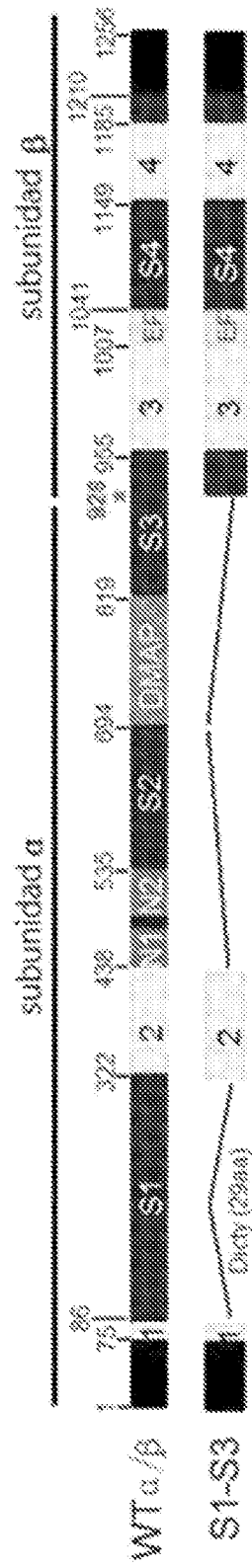
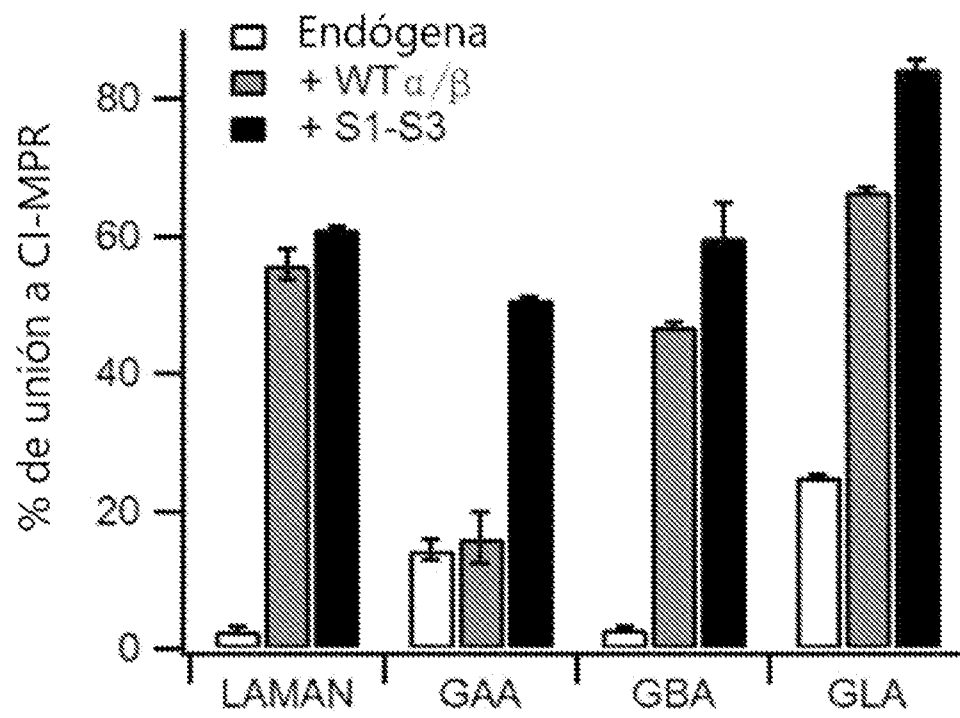


FIG. 12A

**FIG. 12B**

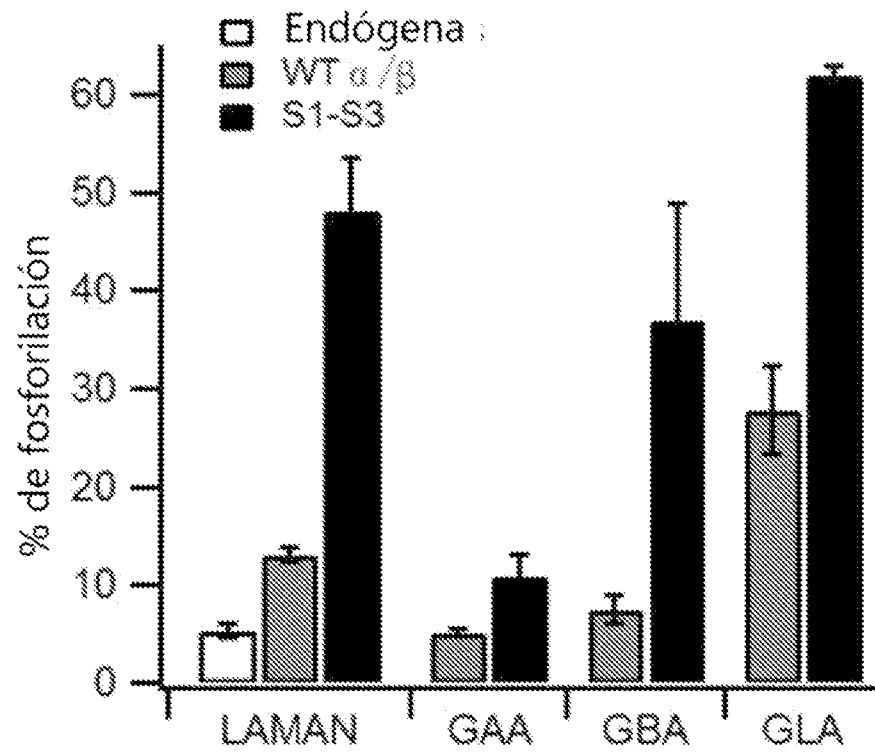


FIG. 12C