



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 439**

51 Int. Cl.:

C07K 5/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02725886 .2**

86 Fecha de presentación : **30.04.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1436316**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Reconocimiento subcelular de proteínas terapéuticas.**

30 Prioridad: **30.04.2001 US 287531 P**
10.07.2001 US 304609 P
15.10.2001 US 329461 P
23.01.2002 US 351276 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **ZyStor Therapeutics , Inc.**
10437 Innovation Drive, Suite 100
Milwaukee, Wisconsin 53226-4868, US

72 Inventor/es: **Lebowitz, Jonathan, H. y**
Beverley, Stephen, M.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 300 439 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

Reconocimiento subcelular de proteínas terapéuticas.

5 Esta invención proporciona un medio para suministrar específicamente proteínas a un compartimento subcelular diana de una célula de mamífero. La capacidad para reconocer proteínas en un compartimento subcelular es de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades metabólicas tales como enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico, una clase de más de 40 trastornos heredados en los cuales enzimas lisosómicas particulares están ausentes o son deficientes.

10

Antecedentes

15 Las carencias de enzimas en compartimentos celulares tales como el aparato de golgi, el retículo endoplásmico y el lisosoma causan una amplia variedad de enfermedades humanas. Por ejemplo, la lisil hidroxilasa, una enzima que se encuentra normalmente en el lumen del retículo endoplásmico, es requerida para el procesamiento apropiado del colágeno; la ausencia de la enzima causa el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI, un trastorno serio del tejido conjuntivo. GnT II, normalmente encontrado en el aparato de golgi, es requerido para la glicosilación normal de proteínas; la ausencia de GnT II conduce a defectos en el desarrollo cerebral. Más de cuarenta enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico (LSD) están causadas, directamente o indirectamente, por la ausencia de una o varias proteínas en el lisosoma.

20 Las enzimas lisosómicas en mamíferos se sintetizan en el citosol y atraviesan el RE donde son glicosiladas con carbohidratos superiores del tipo de manosa N-unidos. En el aparato de golgi, el carbohidrato superior de manosa se modifica en proteínas lisosómicas por la adición de manosa-6-fosfato (M6P) que reconoce estas proteínas en el lisosoma. Las proteínas modificadas con M6P son suministradas al lisosoma vía la interacción con cualquiera de dos receptores de M6P. La forma más favorable de modificación es cuando dos M6P son añadidas a un carbohidrato superior de manosa.

25 La terapia de reemplazo enzimático para enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico (LSD) está siendo activamente seguida. La terapia, excepto en la enfermedad de Gaucher, generalmente requiere que sean incorporadas proteínas LSD y suministradas a los lisosomas de una variedad de tipos de células de una manera dependiente de M6P. Un enfoque posible implica la purificación de una proteína LSD y la modificación de ésta para incorporar un resto carbohidrato con M6P. Este material modificado puede ser incorporado por las células de una manera más eficiente que las proteínas LSD no modificadas debido a la interacción con receptores de M6P en la superficie celular. Sin embargo, debido al gasto de tiempo y el costo requerido para preparar, purificar y modificar proteínas para su uso en el reconocimiento subcelular, hay todavía una necesidad de nuevos métodos más simples, más eficientes y más rentables para reconocer a agentes terapéuticos en un compartimento celular.

30

Sumario de la invención

35 La presente invención facilita el tratamiento de enfermedades metabólicas proporcionando medicamentos de proteínas diana que localizan a un compartimento subcelular de una célula donde el medicamento es necesario. La invención simplifica la preparación de medicamentos de proteínas diana reduciendo los requerimientos para el procesamiento de post-translación o post-síntesis de la proteína. Por ejemplo, un medicamento diana de la presente invención puede ser sintetizado como una proteína de fusión incluyendo un dominio terapéutico y un dominio de reconocimiento de la proteína de fusión en un compartimento subcelular correcto. ("Proteína de fusión", según se usa en este documento, se refiere a un polipéptido simple que tiene al menos dos dominios que no están normalmente presentes en el mismo polipéptido. Así, las proteínas que ocurren naturalmente no son "proteínas de fusión" según se usa en este documento). La síntesis como una proteína de fusión permite el reconocimiento del dominio terapéutico en un compartimento subcelular deseado sin las complicaciones asociadas con la reticulación química de dominios terapéuticos separados y de reconocimiento, por ejemplo.

40 La invención también permite el reconocimiento de un medicamento en un lisosoma de una manera independiente de M6P. En consecuencia, el medicamento diana no tiene que ser sintetizado en una célula de mamífero, sino que puede ser sintetizado químicamente o en una bacteria, levadura, protozoo, u otro organismo independientemente del modelo de glicosilación, facilitándose la producción del medicamento diana con un alto rendimiento y relativamente a un precio bajo. El medicamento diana puede ser sintetizado como una proteína de fusión, simplificándose además la producción, o puede ser generado asociando agentes terapéuticos sintetizados por separado y restos de reconocimiento.

45 La presente invención permite el reconocimiento lisosómico de medicamentos sin necesidad de la adición de M6P al carbohidrato superior de manosa. Está basada en parte en la observación de que uno de los 2 receptores de M6P también se unen a otros ligandos con alta afinidad. Por ejemplo, también se conoce el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes como el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 2 (IGF-II) porque se une a IGF-II con alta afinidad. Este polipéptido de peso molecular bajo interactúa con tres receptores, el receptor de insulina, el receptor de IGF-I y el receptor de M6P/IGF-II. Se cree que ejerce su efecto biológico principalmente a través de

50

55

ES 2 300 439 T3

interacciones con los dos primeros receptores mientras que la interacción con el receptor de M6P independiente de cation, según se piensa, da como resultado predominantemente que IGF-II que sea transportado al lisosoma donde es degradado.

5 En consecuencia, la invención se refiere a un medicamento diana como se especifica en las reivindicaciones.

En una realización, el péptido es un dominio de reconocimiento lisosómico no glicosilado que se une al dominio extracelular del receptor de M6P independiente de cationes humano.

10 El péptido puede ser un dominio de reconocimiento lisosómico que se une al dominio extracelular del receptor de M6P independiente de cationes humano, pero que no se una a una muteína del receptor en el cual el aminoácido 1572 es cambiado de isoleucina a treonina, o se una a la muteína con al menos una afinidad diez veces menor (es decir, con al menos una constante de disociación diez veces mayor). En otra realización, el péptido es un dominio de reconoci-
15 miento lisosómico capaz de unirse a un dominio del receptor que consiste esencialmente en las repeticiones 10-15 del receptor de M6P independiente de cationes humano. Preferiblemente, el dominio de reconocimiento lisosómico puede unirse a un dominio del receptor que consiste esencialmente en las repeticiones 10-13 del receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes. Más preferiblemente, el dominio del reconocimiento lisosómico puede unirse a un dominio de receptor que consista esencialmente en las repeticiones 11-12, repetición 11 o los aminoácidos 1508-1566 del receptor humano independiente de cationes de M6P. En cada una de estas realizaciones, el dominio de reco-
20 nocimiento lisosómico preferiblemente se une al receptor o al dominio del receptor con una constante de disociación submicromolar a o aproximadamente a pH 7,4. En una realización preferida, el dominio de reconocimiento lisosómico se une a una constante de disociación de aproximadamente 10^{-7} M. En otra realización preferida, la constante de disociación es menos que aproximadamente 10^{-7} M.

25 En otra realización, el péptido es suficientemente duplicativo de IGF-II humano tal que el resto de unión se une al receptor de M6P independiente de cationes humano. El péptido puede ser suficientemente duplicativo de IGF-II por la inclusión de una secuencia de aminoácidos suficientemente homóloga a al menos una parte de IGF-II, o por la inclusión de una estructura molecular suficientemente representativa de al menos una parte de IGF-II, tal que el resto de unión se una al receptor de M6P independiente de cationes. En una realización, el péptido comprende un polipéptido
30 que incluye un polipéptido que tiene hélices alfa antiparalelas separadas por no más de cinco aminoácidos. En otra realización, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de IGF-I o de una muteína de IGF-I en la que los aminoácidos 55-56 son cambiados y/o los aminoácidos 1-4 son suprimidos o cambiados. En una realización más, el resto de unión incluye un polipéptido con una secuencia de aminoácidos al menos 60% idéntica al IGF-II humano; los aminoácidos en las posiciones correspondiente a las posiciones 54 y 55 de IGF-II humano están preferiblemente no
35 cargados o están negativamente cargados a o aproximadamente a pH 7,4.

También se describen en este documento ácidos nucleicos que codifican proteínas terapéuticas y células (por ejemplo, células de mamífero, células de insecto, células de levadura, protozoos o bacterias) que comprenden estos ácidos nucleicos. También se describen métodos para producir las proteínas proporcionando estas células con condiciones
40 (por ejemplo, en el contexto de un cultivo *in vitro* o manteniendo las células en un cuerpo de mamífero) permitiendo la expresión de las proteínas. Las proteínas pueden ser cultivadas a partir de entonces (por ejemplo, de ser producidas *in vitro*) o pueden ser usadas que intervenga una etapa de cultivo (por ejemplo, de ser producido *in vivo* en un paciente). Así, se describen en este documento métodos para tratar a un paciente administrando una proteína terapéutica (por ejemplo, por inyección, síntesis *in situ* o de otras maneras), administrando un ácido nucleico que codifica la proteína
45 (permitiéndose así la síntesis de proteínas *in vivo*), o administrando una célula que comprenda un ácido nucleico que codifica la proteína.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es un mapa del marco de lectura abierto de IGF-II humano. El IGF-II maduro carece del péptido señal y regiones divididas por COOH.

La figura 2 es un IGF-II optimizado del codon de *Leishmania* representado en el sitio XbaI de pIR1-SAT.

55 La figura 3 es una representación de una realización preferida de la invención, que incorpora una secuencia del péptido señal, la secuencia de β -glucuronidasa madura humana, un puente de tres aminoácidos y una secuencia de IGF-II.

60 La figura 4 representa la actividad de β -glucuronidasa (GUS) en células GM4668 de fibroblastos de piel de mucopolisacaridosis VII humana expuestas a GUS, una proteína de fusión de GUS-IGF-II (RLIG-GUS), RLIG-GUS con mutaciones Δ 1-7 y Y27L en la parte de IGF-II (RLIG²-GUS), o un control negativo (DMEM).

La figura 5 representa la actividad de GUS en células GM4668 expuestas a GUS (+ β -GUS), GUS-RLIG (+RLIG),
65 GUS-RLIG en presencia de un exceso de IGF-II (+RLIG+IGF-II), o un control negativo (GM4668).

La figura 6 es una alineación de IGF-I humano e IGF-II, que muestra a los dominios A, B, C y D.

ES 2 300 439 T3

La figura 7 representa a GUS en células GM4668 expuestas a GUS, GUS-RLIG, GUS-RLIG, GUS-RLIG con una delección de los siete restos terminales de amino (GUS-RLIG Δ 1-7), GUS-RLIG en presencia de un exceso de IGF-II, GUS-RLIG Δ 1-7 en presencia de un exceso de IGF-II, o un control negativo (Mock).

5

Descripción detallada de la invención

Según se usa en este documento, “reconocimiento lisosómico independiente de la glicosilación” y “RLIG” se refieren a un reconocimiento lisosómico que es independiente de manosa-6-fosfato.

10

Según se usa en este documento, “constructo de RLIG” se refiere a un constructo que incluye una parte de reconocimiento lisosómico independiente de manosa-6-fosfato y una parte terapéutica eficaz en un lisosoma de mamífero.

15

Según se usa en este documento, “GUS” se refiere a β -glucuronidasa, una parte terapéutica ejemplar.

Según se usa en este documento, “GUS-RLIG” se refiere a un constructo de RLIG con GUS acoplado a una parte de reconocimiento de IGF-II.

20

Todas las referencias a las posiciones de aminoácidos en IGF-II se refieren a las posiciones en IGF-II maduro humano. Así, por ejemplo, las posiciones 1, 2 y 3 son ocupadas por alanina, tirosina y arginina, respectivamente.

25

La presente invención facilita el tratamiento de enfermedades metabólicas proporcionando medicamentos diana que, cuando se proporcionan externamente a una célula, entran en la célula y localizan a un compartimento subcelular donde es activo el medicamento diana.

30

Asociación entre agente terapéutico y resto de reconocimiento

La enzima lisosómica y el péptido están necesariamente asociados, directamente o indirectamente. En una realización, la enzima lisosómica y el péptido están asociados no covalentemente. La asociación es preferiblemente estable a o aproximadamente a pH 7,4. Por ejemplo, el resto de reconocimiento puede ser biotinilado y unirse a la avidina asociada con la enzima lisosómica. De forma alternativa, el péptido y la enzima lisosómica pueden cada uno estar asociados (por ejemplo, como proteínas de fusión) con diferentes subunidades de una proteína multimérica. En otra realización, el péptido y la enzima lisosómica están reticulados entre sí (por ejemplo, utilizando un agente de reticulación químico).

35

En una realización preferida, la enzima lisosómica es fusionada al péptido como una proteína de fusión. El péptido puede estar en el extremo amino-terminal de la proteína de fusión, el extremo carboxi-terminal, o puede ser insertado dentro de la secuencia de la enzima lisosómica en una posición donde la presencia del péptido no interfiera excesivamente con la actividad terapéutica de la enzima lisosómica.

40

Cuando la enzima lisosómica es una proteína heteromérica, una o varias de las subunidades pueden estar asociadas con un péptido. La hexosaminidasa A, por ejemplo, una proteína lisosómica que afecta a la enfermedad de Tay-Sachs, incluye una subunidad alfa y una subunidad beta. La subunidad alfa, la subunidad beta, o ambas pueden estar asociadas con un resto de reconocimiento conforme a la presente invención. Si, por ejemplo, la subunidad alfa está asociada con un resto de reconocimiento y es coexpresada con la subunidad beta, se forma un complejo activo y se reconoce de manera apropiada (por ejemplo, al lisosoma).

50

Para reconocer un medicamento en el lisosoma, la enzima lisosómica puede unirse al péptido a través de una interacción que es interrumpida disminuyendo el pH a o aproximadamente a 7,4 a o aproximadamente a 5,5. El resto de reconocimiento se une a un receptor en el exterior de una célula; el receptor seleccionado es uno que sufre la endocitosis y pasa a través del endosoma tardío, que tiene un pH de aproximadamente 5,5. Así, en el endosoma tardío, la enzima lisosómica se disocia del resto de reconocimiento y procede al lisosoma, donde el agente terapéutico actúa. Por ejemplo, un resto de reconocimiento puede ser modificado químicamente para incorporar a un agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA o ácido trinitrilotriacético) que se une fuertemente a un ión metálico tal como el níquel. El resto de reconocimiento (por ejemplo, GUS) puede ser expresado como una proteína de fusión con un marcador de seis-histidina (por ejemplo, en el extremo amino-terminal, en el extremo carboxi-terminal, o en un bucle flexible accesible a la superficie). A o aproximadamente a pH 7,4, el marcador de seis-histidina es sustancialmente desprotonado y se une a iones metálicos tales como el níquel con alta afinidad. A o aproximadamente a pH 5,5, el marcador de seis-histidina está sustancialmente protonado, conduciendo a la liberación del níquel y, por consiguiente, a la liberación del agente terapéutico del resto de reconocimiento.

55

65

Agente terapéutico

Los métodos y las composiciones de la invención son útiles para producir y suministrar enzimas lisosómicas a un lisosoma, y la invención es particularmente útil para suministrar enzimas lisosómicas para tratar enfermedades metabólicas, tales como enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico (LSD).

Los genes de LSD preferidos son mostrados en la Tabla 1. En una realización preferida, un producto génico de LSD tipo silvestre es suministrado a un paciente que sufre de un defecto en el mismo gen de LSD. En realizaciones alternativas, es usada una secuencia funcional o variante de especie del gen de LSD. En otras realizaciones, un gen que codifica para una enzima diferente que puede rescatar un gen de LSD defectuoso es usado de acuerdo con los métodos de la invención.

TABLA 1

Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

A. Trastornos de la glucogenosis		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Pompe	Ácido α 1-,4-glucosidasa	Oligosacáridos 1-4 unidos a glucógeno
B. Trastornos de glucolipidosis		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Gangliosidosis GM ₁	β -Galactosidasa	Gangliósidos GM ₁
Enfermedad de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A	Gangliósido GM ₂
Gangliosidosis GM ₂ : Variante AB	Proteína activadora GM ₂	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa A & B	Gangliósido GM ₂

Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A	Globósidos
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A	Sulfátidos
Enfermedad de Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactocerebrósido
Niemann-Pick, Tipos A y B	Esfingomielinasa ácida	Esfingomielina
Niemann-Pick, Tipo C	Defecto de esterificación de colesterol	Esfingomielina
Nieman-Pick, Tipo D	Desconocido	Esfingomielina
Enfermedad de Farber	Ceramidasa ácida	Ceramida
Enfermedad de Wolman	Lipasa ácida	Ésteres de colesterilo
C. Trastornos de mucopolisacáridos		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Síndrome de Hurler (MPS IH)	α -L-Iduronidasa	Sulfatos de Heparan & Dermatan
Síndrome de Scheie (MPS IS)	α -L-Iduronidasa	Sulfatos de Heparan & Dermatan
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α -L-Iduronidasa	Sulfatos de Heparan & Dermatan
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato sulfatasa	Sulfatos de Heparan & Dermatan
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparan N-sulfatasa	Sulfatos de Heparan
Sanfilippo B (MPS IIIB)	α -N-Acetilglucosaminidasa	Sulfatos de Heparan
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA-glucosaminida acetiltransferasa	Sulfatos de Heparan
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-Acetilglucosamina-6-sulfatasa	Sulfatos de Heparan
Morquio A (MPS IVA)	Galactosamina-6-sulfatasa	Sulfato de Keratan
Morquio B (MPS IVB)	β -Galactosidasa	Sulfato de Keratan
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B	Sulfato de Dermatan
Síndrome de Sly (MPS VII)	β -Glucuronidasa	

D. Trastornos de oligosacárido/glicoproteína		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
α -Manosidosis	α -Manosidasa	Manosa/Oligosacáridos
β -Manosidosis	β -Manosidasa	Manosa/Oligosacáridos
Fucosidosis	α -L-Fucosidasa	Oligosacáridos de fucosilo
Asparilglucosaminuria	N-Aspartil- β -glucosaminidasa	Asparaginas de asparilglucosamina
Sialidosis (Mucopolipidosis I)	α -Neuraminidasa	Sialiloligosacáridos
Galactosialidosis (síndrome de Goldberg)	Deficiencia proteínica protectora lisosómica	Sialiloligosacáridos
Enfermedad de Schindler	α -N-Acetil-galactosaminidasa	
E. Trastornos del transporte enzimático lisosómico		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Mucopolipidosis II (Enfermedad I-célula)	N-Acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Sulfato de Heparan
Mucopolipidosis III (Polidistrofia de pseudo-Hurler)	Igual que ML II	
F. Trastornos de transporte de membrana lisosómicos		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Cistinosis	Proteína de transporte de cistina	Cistina libre
Enfermedad de Salla	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico libre y ácido glucurónico
Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico infantil	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico libre y ácido glucurónico
G. Otros		
Nombre de enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Batten	Desconocido	Lipofuscinas

(Lipofuscinosis neuronal juvenil)	ceroide		
Lipofuscinosis neuronal juvenil	ceroide	Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscinas
Mucopolidosis IV		Desconocido	Gangliósidos y ácido hialurónico
Prosaposina		Saposinas A, B, C o D	

Una enzima lisosómica particularmente preferida es la glucocerebrosidasa, fabricada actualmente por Genzyme como una terapia de reemplazo enzimático eficaz para la enfermedad de Gaucher. Actualmente, la enzima se prepara con restos de manosa expuestos, que reconoce la proteína específicamente en células del linaje de macrófago. Aunque la patología primaria en los pacientes de Gaucher tipo 1 es debida a macrófagos que acumulan glucocerebrosidos, pueda ser una ventaja terapéutica el suministro de glucocerebrosidasa a otros tipos de células. El reconocimiento de glucocerebrosidasa en lisosomas usando la presente invención reconocerían al agente en múltiples tipos de células y puede tener una ventaja terapéutica comparado con otros preparativos.

Dominios de reconocimiento subcelulares

La presente invención permite reconocer una enzima lisosómica en un lisosoma usando una proteína, o un análogo de proteína, que se une específicamente a un receptor celular para aquella proteína. El exterior de la superficie celular es topológicamente equivalente a un compartimento lisosómico. Así, la endocitosis de una molécula a través de la interacción con un(os) receptor(es) apropiado(s) permite el transporte de la molécula a un lisosoma sin cruzar ninguna membrana. Si una deficiencia genética causa un déficit de una actividad enzimática particular en cualquiera de estos compartimentos lisosómicos, el suministro de una proteína terapéutica puede ser lograda por el marcado con un ligando para el(los) receptor(es) apropiado(s).

Restos de reconocimiento lisosómico

La invención permite el reconocimiento de una enzima lisosómica en un lisosoma. El reconocimiento puede ocurrir, por ejemplo, por la unión de un receptor de membrana celular que más tarde pasa a través de un lisosoma. De forma alternativa, el reconocimiento puede ocurrir por la unión de un receptor del plasma que más tarde pasa por un endosoma tardío; la enzima lisosómica entonces puede viajar desde el endosoma tardío a un lisosoma. Un mecanismo de reconocimiento lisosómico preferido implica la unión al receptor de M6P independiente de cationes.

Receptor de M6P independiente de cationes

El receptor de M6P independiente de cationes es una glicoproteína transmembrana de cadena simple de 275 kDa expresada por todas partes en tejidos de mamífero. Es uno de dos receptores de mamífero que se unen a M6P: el segundo se denomina receptor de M6P dependiente de cationes. El receptor de M6P dependiente de cationes requiere cationes divalentes para la unión de M6P; el receptor de M6P independiente de cationes no lo requiere. Estos receptores juegan un papel importante en el tráfico de enzimas lisosómicas a través del reconocimiento del resto M6P en el carbohidrato superior de manosa en enzimas lisosómicas. El dominio extracelular del receptor de M6P independiente de cationes contiene 15 dominios homólogos ("repeticiones") que une un grupo diverso de ligandos en posiciones discretas sobre el receptor.

El receptor de M6P independiente de cationes contiene dos sitios de unión para M6P: uno localizado en las repeticiones 1-3 y el otro localizado en las repeticiones 7-9. El receptor une ligandos de M6P monovalentes con una constante de disociación en el intervalo μM uniendo ligandos de M6P divalentes con una constante de disociación en el intervalo nM, probablemente debido a la oligomerización del receptor. La incorporación de IGF-II por el receptor es aumentada por la unión concomitante de ligandos de M6P multivalentes tales como enzimas lisosómicas al receptor.

El receptor de M6P independiente de cationes también contiene sitios de unión para al menos tres ligandos distintos que pueden ser usados como de restos de reconocimiento. El receptor de M6P independiente de cationes se une a IGF-II con una constante de disociación de aproximadamente 14 nM a o aproximadamente a pH 7,4, principalmente a través de interacciones con la repetición 11. Compatible con su función en el reconocimiento de IGF-II al lisosoma, la constante de disociación aumenta aproximadamente 100 veces a o aproximadamente a pH 5,5 promoviendo la disociación de IGF-II en endosomas tardíos ácidos. El receptor es capaz de unir formas de IGF-II O-glicosiladas de alto peso molecular.

Un ligando útil adicional para el receptor de M6P independiente de cationes es el ácido retinoico. El ácido retinoico se une al receptor con una constante de disociación de 2,5 nM. El fotomarcado de afinidad del receptor de M6P independiente de cationes con ácido retinoico no interfiere con la unión de IGF-II o M6P al receptor, indicando que el ácido retinoico se une a un sitio distinto en el receptor. La unión del ácido retinoico al receptor cambia la distribución intracelular del receptor con una mayor acumulación del receptor en las vesículas citoplásmicas y también potencia la respuesta de β -glucuronidasa modificada con M6P. El ácido retinoico tiene un resto fotoactivable que puede ser usado para unirlo a un agente terapéutico sin interferir con su capacidad para unirse al receptor de M6P independiente de cationes.

El receptor de M6P independiente de cationes también se une al receptor de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) con una constante de disociación de 9 μ M. El uPAR es un receptor de GPI-ancorado sobre la superficie de la mayor parte de tipos de células donde funciona como una molécula de adhesión y en la activación proteolítica de plasminógenos y TGF- β . La unión de uPAR al receptor de CI-M6P lo reconoce en el lisosoma, modulándose así su actividad. Así, la fusión del dominio extracelular de uPAR, o su parte competente que se une al receptor de M6P independiente de cationes, a una enzima lisosómica permite el reconocimiento de la enzima en un lisosoma.

IGF-II

Ventajosamente, la invención imita el mecanismo biológico normal de respuesta de proteínas LSD, de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

Por ejemplo, fusionando el ADN que codifica el polipéptido IGF-II maduro al extremo 3' de casetes del gen de LSD, son creadas proteínas de fusión que pueden ser incorporadas por una variedad de tipos de células y transportadas al lisosoma. Este método tiene numerosas ventajas respecto a métodos que implican la glicosilación incluyendo la simplicidad y la rentabilidad, porque una vez que la proteína está aislada, no se necesitan hacer más modificaciones.

El IGF-II es preferiblemente reconocido específicamente con el receptor de M6P. Particularmente útiles son las mutaciones en el polipéptido de IGF-II que causan una proteína que se une al receptor de M6P con alta afinidad mientras que no se unan los otros dos receptores con una afinidad apreciable. El IGF-II también puede ser modificado para reducir al mínimo la unión a las proteínas de unión a IGF en suero (Baxter (2000) *Am. J. Physiol Endocrinol Metab.* **278** (6): 967-76) para evitar el secuestro de los constructos de IGF-II/RLIG. Un número de estudios han localizado restos en IGF-1 y IGF-II necesarios para unir las proteínas de unión de IGF. Los constructos con mutaciones en estos restos pueden ser seleccionados para la retención de unión de alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II y para la afinidad reducida para las proteínas de unión de IGF. Por ejemplo, sustituyendo PHE 26 de IGF-II con SER, según se ha publicado, se reduce la afinidad de IGF-II para IGFBP-1 y -6 sin afectar a la unión al receptor de M6P/IGF-II (Bach *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (13): 9246-54). Otras sustituciones, tales como SER por PHE 19 y LYS por GLU9, también pueden ser ventajosas. Las mutaciones análogas, separadamente o en combinación, en una región de IGF-I que es altamente conservadora con IGF-II causan grandes disminuciones en la unión de IGF-BP (Magee *et al.* (1999) *Biochemistry* **38** (48):15863-70).

Un enfoque alternativo es identificar las regiones mínimas de IGF-II que pueden unirse con alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II. Los restos que han sido implicados en la unión de IGF-II al receptor de M6P/IGF-II sobre todo se agrupan en una cara de IGF-II (Terasawa *et al.* (1994) *EMBO J.* **13** (23): 5590-7). Aunque la estructura terciaria de IGF-II normalmente sea mantenida por tres puentes disulfuro intramoleculares, incorporando un péptido la secuencia de aminoácidos en la superficie de unión del receptor de M6P/IGF-II de IGF-II puede ser diseñada para plegar correctamente y tener actividad de unión. Tal péptido de unión mínimo es una parte de reconocimiento altamente preferida. Los péptidos diseñados basados en la región alrededor de los aminoácidos 48-55 pueden ser analizados para la unión al receptor de M6P/IGF-II. De forma alternativa, una biblioteca arbitraria de péptidos puede ser rastreada por su capacidad de unir el receptor de M6P/IGF-II vía un ensayo en levadura de dos híbridos, o vía un ensayo tipo de expresión en fago.

Barrera sangre-cerebro

Un reto en la terapia para enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico es que muchas de estas enfermedades tienen una implicación neurológica significativa. Las enzimas terapéuticas administradas en la circulación sanguínea generalmente no cruzan la barrera sangre-cerebro y por lo tanto no pueden reducir los síntomas neurológicos asociados con las enfermedades. El IGF-II, sin embargo, como se ha mencionado, promueve el transporte a través de la barrera sangre-cerebro vía transcitosis (Bickel *et al.* (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (1-3): 247-79). Por lo tanto, los constructos de RLIG diseñados de manera apropiada deberían ser capaces de cruzar la barrera sangre-cerebro, proporcionando por primera vez un medio para tratar síntomas neurológicos asociados con enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico. Los constructos pueden ser analizados usando ratones deficientes de GUS como se describe en el Ejemplo 7, *infra*. Además los detalles en cuanto al diseño, la construcción y las pruebas de medicamentos diana que pueden alcanzar el tejido neuronal desde la sangre son descritos en la publicación de EE.UU. N.º. 2003-0072761 A1, presentada el 30 de abril de 2002.

Estructura de IGF-II

Las estructuras por RMN de IGF-II han sido resueltas por dos grupos (Terasawa *et al.* (1994) *EMBO J.* **13** (23): 5590-7; Torres *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.* **248** (2): 385-401) (véase, por ejemplo, el banco de datos de proteína IIGL record). Las características generales de la estructura de IGF-II son similares a las de IGF-I e insulina. Los dominios A y B de IGF-II corresponden a las cadenas de A y B de insulina. Las características estructurales secundarias incluyen una hélice alfa a partir de los restos 11-21 de la región B unida por una vuelta inversa en los restos 22-25 a una cadena beta corta en los restos 26-28. Los restos 25-27 parecen formar una pequeña hoja beta antiparalela; los restos 59-61 y los restos 2628 también pueden participar en la formación de hoja beta intermolecular. En el dominio A de IGF-II, las hélices alfa que atraviesan los restos 42-49 y 53-59 están dispuestas en una configuración antiparalela perpendicular a la hélice del dominio B. Los grupos hidrófobos formados por dos de los tres puentes disulfuro y los restos hidrófobos conservados estabilizan estas características de estructura secundarias. Los extremos N y C permanecen mal definidos porque es la región entre los restos 31-40.

IGF-II se une a los receptores de IGF-II/M6P y IGF-I con relativamente alta afinidad y se une con una afinidad inferior al receptor de insulina. IGF-II también interactúa con un número si IGFBP está en suero.

Unión al receptor de IGF-II/M6P

La sustitución de los restos 48-50 de IGF-II (Phe Arg Ser) con los restos correspondientes de insulina, (Thr Ser Ile), o la sustitución de los restos 54-55 (Ala Leu) con los restos correspondientes de IGF-I (Arg Arg) causa una menor unión al receptor de IGF-II/M6P, pero la retención de la unión a los receptores de IGF-I e insulina (Sakano *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (31): 20626-35).

IGF-I y IGF-II comparten secuencias idénticas y estructuras en la región de los restos 48-50 aunque tengan una diferencia de 1000 veces en la afinidad para el receptor de IGF-II. La estructura por RMN revela una diferencia estructural entre IGF-I y IGF-II en la región de los restos 53-58 de IGF-II (restos 54-59 de IGF-I): la hélice alfa está mejor definida en IGF-II que en IGF-I y, a pesar de IGF-I, no hay ninguna curva en la estructura alrededor de los restos 53 y 54 (Torres *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.* **248** (2): 385-401). Esta diferencia estructural se correlaciona con la sustitución de Ala 54 y Leu 55 en IGF-II con Arg 55 y Arg 56 en IGF-I. Es posible que la unión al receptor de IGF-II esté directamente interrumpida por la presencia de restos cargados en esta región o que los cambios de la estructura engendrada por los restos cargados proporcionen los cambios de unión para el receptor de IGF-II. En cualquier caso, la sustitución de restos no cargados para los dos restos de Arg en IGF-I causó afinidades más altas para el receptor de IGF-II (Cacciari *et al.* (1987) *Pediatrician* **14** (3): 146-53). Así la presencia de restos positivamente cargados en estas posiciones tiene correlación con la pérdida de unión al receptor de IGF-II.

El IGF-II se une a la repetición 11 del receptor de M6P independiente de cationes. En realidad, un minireceptor en el cual sólo la repetición 11 es fusionada a los dominios transmembrana y citoplásmicos del receptor de M6P independiente de cationes es capaz de unirse a IGF-II (con una afinidad aproximadamente de un décimo de la afinidad del receptor de cadena completa) y mediar la internalización de IGF-II y su suministro a los lisosomas (Grimmeit *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275** (43): 33697-33703). Se conoce la estructura del dominio 11 del receptor de M6P (entradas de la base de datos de proteínas 1GPO y 1GP3; Brown *et al.* (2002) *EMBO J.* **21** (5): 1054-1062). El supuesto sitio de unión de IGF-II es una bolsa hidrófoba que se piensa que interactúa con aminoácidos hidrófobos de IGF-II; los aminoácidos candidatos de IGF-II incluyen leucina 8, fenilalanina 48, alanina 54 y leucina 55. Aunque la repetición 11 sea suficiente para la unión de IGF-II, los constructos que incluyen partes más grandes del receptor de M6P independiente de cationes (por ejemplo, las repeticiones 10-13 ó 1-15) generalmente se unen a IGF-II con mayor afinidad y con una mayor dependencia del pH (véase, por ejemplo, Linnell *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276** (26):23986-23991).

Unión al receptor de IGF-I

La sustitución de los restos de IGF-II Tyr 27 con Leu, Leu 43 con Val o Ser 26 con Phe disminuye la afinidad de IGF-II para el receptor de IGF-I 94, 56 y 4 veces respectivamente (Torres *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.* **248** (2):385-401). La delección de los restos 1-7 de IGF-II humano causó una disminución de 30 veces la afinidad para el receptor humano de IGF-I y un aumento de 12 veces concomitante de la afinidad para el receptor de IGF-II en ratas (Hashimoto *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (30):18013-8). La estructura por RMN de IGF-II muestra que Thr 7 está localizado cerca de los restos 48 Phe y 50 Ser así como cerca del puente de disulfuro 9 Cys-47 Cys. Se piensa que la interacción de Thr 7 con estos restos puede estabilizar el hexapéptido del extremo N-terminal flexible requerido para la unión del receptor de IGF-I (Terasawa *et al.* (1994) *EMBO J.* **13** (23) 5590-7). Al mismo tiempo esta interacción puede modular la unión al receptor de IGF-II. El truncamiento del extremo C-terminal de IGF-II (restos 62-67) también parece bajar 5 veces la afinidad de IGF-II para el receptor de IGF-I (Roth *et al.* (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181** (2): 907-14).

Los mutantes de delección de IGF-II

Las superficies de unión para los receptores de IGF-I y M6P independiente de cationes están sobre las caras separadas de IGF-II. Basado en los datos estructurales y mutacionales, los dominios de unión de M6P independiente de cationes funcionales pueden ser construidos siendo sustancialmente más pequeños que el IGF-II humano. Por ejemplo, los aminoácidos del extremo amino-terminal 1-7 y/o los restos del extremo carboxi-terminal 62-67 pueden

ser suprimidos o sustituidos. Además, los aminoácidos 29-40 pueden ser eliminados o sustituidos probablemente sin cambiar el plegado del resto del polipéptido o la unión al receptor de M6P independiente de cationes. Así, puede ser construido un resto de reconocimiento incluyendo los aminoácidos 8-28 y 41-61. Estos tramos de aminoácidos podrían ser unidos quizás directamente o ser separados por un enlazador. De forma alternativa, los aminoácidos 8-28 y 41-61 pueden ser proporcionados en cadenas polipeptídicas separadas. Los dominios comparables de insulina, que es homóloga a IGF-II y que tiene una estructura terciaria estrechamente relacionada con la estructura de IGF-II, tienen la información estructural suficiente para permitir un nuevo plegado apropiado en la estructura terciaria apropiada, incluso cuando estén presentes en cadenas polipeptídicas separadas (Wang *et al.* (1991) *Trends. Biochem. Sci.* 279-281). Así, por ejemplo, los aminoácidos 8-28, o su variante de sustitución conservadora, podrían ser fusionados a una enzima lisosómica; la proteína de fusión resultante podría ser mezclada con los aminoácidos 41-61, o su variante de sustitución conservadora, y ser administrada a un paciente.

Unión a proteínas de unión de IGF

Los constructos de IGF-II y relacionados pueden ser modificados para disminuir su afinidad con IGFBP, aumentando así la biodisponibilidad de las proteínas marcadas.

La sustitución del resto de IGF-II fenilalanina 26 con serina reduce la unión a los IGFBP 1-5 unas 5-75 veces (Bach *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (13): 9246-54). El reemplazo de los restos 48-50 de IGF-II con treonina-serina-isoleucina reduce la unión más de 100 veces en la mayor parte de los IGFBP (Bach *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268** (13): 9246-54); estos restos son, sin embargo, también importantes para unirse al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes. La sustitución Y27L que interrumpe la unión al receptor de IGF-I interfiere con la formación del complejo ternario con IGFBP3 y la subunidad lábil ácida (Hashimoto *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272** (44): 27936-42); este complejo ternario cuenta para la mayor parte del IGF-II en la circulación (Yu *et al.* (1999) *J. Clin. Lab Anal.* **13** (4): 166-72). La delección de los seis primeros restos de IGF-II también interfiere con la unión de IGFBP (Luthi *et al.* (1992) *Eur. J. Biochem.* **205** (2):4 483-90).

Los estudios sobre la interacción de IGF-I con los IGFBP revelaron además que la sustitución de serina por fenilalanina 16 no afectó a la estructura secundaria, pero disminuyó la unión de IGFBP entre 40 y 300 veces (Magee *et al.* (1999) *Biochemistry* **38** (48): 15863-70). El cambio del glutamato 9 con lisina también causó una disminución significativa de la unión de IGFBP. Además, el doble mutante lisina 9/serina 16 exhibió la afinidad más baja para los IGFBP. Aunque estas mutaciones no hayan sido analizadas antes en IGF-II, la conservación de la secuencia entre esta región de IGF-I y IGF-II sugiere que un efecto similar sería observado cuando fueron hechas mutaciones análogas en IGF-II (glutamato 12 lisina/fenilalanina 19 serina).

Homólogos de IGF-II

La secuencia de aminoácidos de IGF-II humano, o su parte que afecta a la unión al receptor de M6P independiente de cationes, puede ser usada como una secuencia de referencia para determinar si una secuencia candidato posee la semejanza de aminoácidos suficiente para tener una expectativa razonable de éxito en los métodos de la presente invención. Preferiblemente, las secuencias de la variante son al menos un 70% similar o 60% idéntica, más preferiblemente al menos un 75% similar o 65% idéntica, y lo más preferiblemente 80% similar o 70% idéntica respecto al IGF-II humano.

Para determinar si una región peptídica candidato tiene el porcentaje de semejanza preciso o la identidad respecto al IGF-II humano, la secuencia de aminoácidos candidato y de IGF-II humano son alineadas primero usando el algoritmo de programación dinámica descrito en Smith y Waterman (1981) *J. Mol. Biol.* **147**: 195-197, en combinación con la matriz de sustitución BLOSUM62 descrita en la Figura 2 de Henikoff y Henikoff (1992) *PNAS* **89**: 10915-10919. Para la presente invención, un valor apropiado para la penalización de inserción de huecos es -12, y un valor apropiado para la penalización por extensión de huecos es -4. Los programas informáticos que realizan alineamientos usando el algoritmo de Smith-Waterman y la matriz BLOSUM62, tal como la serie del programa GCG (Grupo Molecular de Oxford, Oxford, Inglaterra), están disponibles en el comercio y son ampliamente usados por los expertos en la técnica.

Una vez que el alineamiento entre la secuencia candidato y de referencia es hecha, puede ser calculada una puntuación de la semejanza en porcentaje. Los aminoácidos individuales de cada secuencia son comparados secuencialmente de acuerdo con su semejanza entre sí. Si el valor en la matriz BLOSUM62 correspondiente a los dos aminoácidos alineados puntúa cero o un número negativo, la semejanza por parejas es cero; de otra forma la semejanza por parejas puntúa 1,0. La puntuación de semejanza bruta es la suma de las puntuaciones de semejanza por parejas de los aminoácidos alineados. La puntuación sin procesar entonces se normaliza dividiéndola por el número de aminoácidos en la más pequeña de las secuencias de referencia o candidato. La puntuación sin procesar normalizada es el porcentaje de semejanza. De forma alternativa, para calcular un porcentaje de identidad, los aminoácidos alineados de cada secuencia son comparados secuencialmente de nuevo. Si los aminoácidos no son idénticos, la puntuación de identidad por parejas puntúa cero; de otra manera la puntuación de identidad por parejas puntúa 1,0. La puntuación de identidad sin procesar es la suma de los aminoácidos idénticos alineados. La puntuación sin procesar entonces es normalizada dividiéndola por el número de aminoácidos idénticos alineados. La puntuación sin procesar entonces es normalizada dividiéndola por el número de aminoácidos en la más pequeña de las secuencias de referencia o candidato. La puntuación sin procesar normalizada es el porcentaje de identidad. Las inserciones y delecciones no son tomadas en cuenta para los objetivos del cálculo del porcentaje de semejanza e identidad. En consecuencia, las penalizaciones de hueco no son usadas en este cálculo, aunque sean usadas en el alineamiento inicial.

Análogos estructurales de IGF-II

Las estructuras conocidas de los receptores de IGF-II humano y M6P independiente de cationes permiten el diseño de análogos de IGF-II y otras proteínas de unión del receptor de M6P independiente de cationes usando principios de diseño informáticos tales como los discutidos en las patentes de EE.UU. N^{os}. 6.226.603 y 6.273.598. Por ejemplo, las coordenadas atómicas conocidas de IGF-II pueden ser proporcionadas a un ordenador equipado con un programa de modelado por ordenador convencional, tales como INSIGHTII, DISCOVER O DELPHI, disponible en el comercio en Biosym, Tecnologías Inc., o QUANTAS o CHARMM, disponibles en el comercio en Molecular Simulations, Inc. Estos y otros programas de software permiten el análisis de estructuras moleculares y simulaciones que predicen el efecto de cambios moleculares sobre la estructura y sobre interacciones intermoleculares. Por ejemplo, el software puede ser usado para identificar análogos modificados con capacidad para formar enlaces de hidrógeno intermoleculares adicionales o iónicos, mejorando la afinidad del análogo para el receptor diana.

El software también permite el diseño de péptidos y moléculas orgánicas con propiedades estructurales y químicas que imitan las mismas propiedades mostradas en al menos parte de la superficie de la cara de unión del receptor de M6P independiente de cationes de IGF-II. Como una contribución principal a la superficie de unión del receptor está la disposición espacial de restos químicamente interactivos presentes dentro de las cadenas laterales de los aminoácidos que definen juntas la superficie de unión del receptor, una realización preferida de la presente invención se refiere al diseño y a la producción de una molécula orgánica sintética que tiene un marco que lleva restos químicamente interactivos en una relación espacial que imita la relación espacial de los restos químicos dispuestos en las cadenas laterales del aminoácido que constituye la cara de unión del receptor de M6P independiente de cationes de IGF-II. Los restos químicos preferidos, incluyen, pero no limitados, a los restos químicos definidos por las cadenas laterales de aminoácidos de los aminoácidos que constituyen la cara de unión del receptor de M6P independiente de cationes de IGF-II. Se sobrentiende, por lo tanto, que la superficie de unión del receptor del análogo de IGF-II no tiene que comprender restos de aminoácidos, pero sí los restos químicos dispuestos sobre ello.

Por ejemplo, en la identificación de grupos químicos relevantes, el experto en la técnica que use un programa informático convencional puede diseñar una pequeña molécula que tenga los restos químicos interactivos con el receptor dispuestos sobre un marco vehículo adecuado. Los programas informáticos útiles son descritos, por ejemplo, en Dixon (1992) *Tibtech* **10**:357-363; Tschinke *et al.* (1993) *J. Med. Chem* **36**: 3863-3870; y Eisen *et al.* (1994) *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **19**: 199-221, cuyas descripciones son incorporadas en este documento como referencia.

Un programa informático particular titulado "CAVEAT" busca en una base de datos, por ejemplo, la base de datos estructural de Cambridge, para estructuras que tengan orientaciones espaciales deseadas de restos químicos (Bartlett *et al.* (1989) en "Molecular Recognition: Chemical and Biological Problems" (Roberts, S. M., editor) págs. 182-196). El programa CAVEAT ha sido usado para diseñar análogos de tendamistat, un inhibidor de 74 restos de α -amilasa, basado en la orientación de las cadenas laterales de aminoácido seleccionadas en la estructura tridimensional del tendamistat (Bartlett *et al.* (1989) *supra*).

De forma alternativa, en la identificación de una serie de análogos que imitan la actividad de unión del receptor de M6P independiente de cationes de IGF-II, el experto en la técnica puede usar una variedad de programas informáticos que ayudan al experto en la técnica a desarrollar relaciones cuantitativas entre estructura y actividad (QSAR) y además para ayudar al diseño *de novo* de análogos adicionales de morfogenes. Otros programas informáticos útiles son los descritos, por ejemplo, en Connolly-Martin (1991) *Methods in Enzymology* **203**:587-613; Dixon (1992) *supra*; y Waszkowycz *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* **37**:3994-4002.

Afinidades del resto de reconocimiento

Los restos de reconocimiento preferidos se unen a sus receptores diana con una constante de disociación submicromolar. Por lo general, las constantes de disociación bajas (por ejemplo, menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, o menos de 10^{-9} M) son cada vez más preferidas. La determinación de las constantes de disociación preferiblemente se determina mediante resonancia de plasmon de superficie como se describe en Linnell *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276** (26): 23986-23991. Una forma soluble del dominio extracelular del receptor diana (por ejemplo, las repeticiones 1-15 del receptor de M6P independiente de cationes) es generada e inmovilizada en un chip por una interacción biotina-avidina. El resto de reconocimiento es pasado por el chip, y las constantes cinéticas y de equilibrio son detectadas y calculadas midiendo los cambios de la masa asociada con la superficie del chip.

Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

Pueden ser expresadas proteínas de fusión quiméricas en una variedad de sistemas de expresión, incluyendo sistemas de traducción *in vitro* y células intactas. Ya que la modificación de M6P no es un requisito previo para el reconocimiento, una variedad de sistemas de expresión, incluyendo sistemas de levadura, baculovirus y hasta procariontes tales como *E. coli* que no glicosilan las proteínas, son adecuados para la expresión de proteínas terapéuticas diana. De hecho, una proteína no glicosilada generalmente tiene mejor biodisponibilidad, ya que las proteínas glicosiladas son rápidamente limpiadas de la circulación por la unión al receptor de manosa en el endotelio sinusoidal hepático.

De forma alternativa, la producción de enzimas lisosómicas quiméricas diana en el sistema de expresión celular de mamífero produce proteínas con múltiples determinantes de unión para el receptor de M6P independiente de cationes. Las sinergias entre dos o más ligandos del receptor de M6P independiente de cationes (por ejemplo, M6P y IGF-II, o M6P y ácido retinoico) pueden ser explotadas: se ha demostrado que los ligandos multivalentes realzan la unión al receptor por la reticulación del receptor.

En general, pueden ser adaptados casetes génicos que codifican la enzima lisosómica quimérica para el sistema de expresión particular para incorporar las secuencias necesarias para la expresión óptima incluyendo a promotores, sitios de unión ribosómicos, intrones o alteraciones en la secuencia de codificación para optimizar el uso del codon. Como la enzima es secretada preferiblemente desde la célula productora, un ADN que codifique un péptido señal compatible con el sistema de expresión puede ser sustituido por el péptido señal endógeno. Por ejemplo, para la expresión de β -glucuronidasa y α -galactosidasa marcada con IGF-II en *Leishmania*, los casetes de ADN que codifican péptidos señal de *Leishmania* (GP63 o SAP) son insertados en el lugar del ADN que codifica el péptido señal endógeno para alcanzar la expresión óptima. En sistemas de expresión de mamífero, puede ser empleado el péptido señal endógeno, pero si el marcador de IGF-II está fusionado en el extremo 5' de la secuencia de codificación, podría ser deseable usar el péptido señal de IGF-II.

Las células CHO son un huésped de mamífero preferido para la producción de enzimas lisosómicas. El método clásico para lograr la expresión de células CHO con alto rendimiento es usar una línea celular CHO deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR), por ejemplo la línea de CHO DUKX (O'Dell *et al.* (1998) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30** (7): 767-71). Esta cepa de células CHO requiere hipoxantina y timidina para su crecimiento. La cotransfección del gen que se sobreexpresa con un casete génico de DHFR, en plásmidos separados o en un plásmido simple, permite la selección del gen de DHFR y generalmente permite el aislamiento de clones que también expresan la proteína recombinante de elección. Por ejemplo, el plásmido pcDNA3 usa el promotor de la región reguladora de la región temprana del citomegalovirus (CMV) para llevar a cabo la expresión de un gen de interés y pSV2DHFR para promover la expresión de DHFR. La exposición subsecuente de células que llevan los casetes génicos recombinantes a concentraciones incrementalmente crecientes del análogo de folato metotrexato conduce a la amplificación tanto del número de copia génico del gen de DHFR como del gen co-transfectado.

Un plásmido preferido para la expresión eucariota en este sistema contiene el gen de interés colocado corriente abajo de un promotor fuerte tal como CMV. Un intrón puede ser colocado en el flanco 3' del casete génico. Se puede dirigir un casete de DHFR por un segundo promotor desde el mismo plásmido o desde un plásmido separado. Además, puede ser útil incorporar en el plásmido un marcador seleccionable adicional tal como la neomicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a G418.

De forma alternativa, pueden ser producidas enzimas recombinantes en la línea celular HEK 293 humana usando sistemas de expresión basados en el sistema de replicación del virus Epstein-Barr (EBV). Este consiste en el origen de replicación de EBV oriP y la proteína de unión de ori de EBV, EBNA-1. La unión de EBNA-1 a oriP inicia la replicación y la amplificación subsecuente del plásmido extracromosómico. Esta amplificación a su vez causa altos niveles de expresión de los casetes génicos almacenados dentro del plásmido. Los plásmidos que contienen *oriP* pueden ser transfectados en células HEK 293 transformadas con EBNA-1 (disponible en el comercio de Invitrogen) o, de forma alternativa, puede ser empleado un plásmido tal como pCEP4 (disponible en el comercio de Invitrogen) que conduce a la expresión de EBNA-1 y que contiene *oriP* de EBV.

En *E. coli*, preferiblemente son secretadas las enzimas lisosómicas en el espacio periplásmico. Esto puede ser logrado sustituyendo para el ADN que codifica el péptido señal endógeno de la enzima lisosómica un casete de ácido nucleico que codifica un péptido señal bacteriano tal como la secuencia señal de *ompA*. Se puede llevar a cabo la expresión por cualquiera de un número de promotores inducibles fuertes tales como los promotores *lac*, *trp* o *tac*. Un vector adecuado es pBAD/gIII (disponible en el comercio de Invitrogen) que usa el péptido señal de Gene III y el promotor araBAD.

Repliegue in vitro

Un parte de reconocimiento de IGF-II útil tiene tres puentes disulfuro intramoleculares. Pueden ser construidas proteínas de fusión RLIG (por ejemplo GUS-RLIG) en *E. coli* para dirigir la proteína al espacio periplásmico. IGF-II, cuando se fusiona al extremo C-terminal de otra proteína, puede ser secretado en una forma activa en el espacio periplásmico de *E. coli* (Wadensten *et al.* (1991) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13** (3): 412-21). Para facilitar el plegado óptimo del resto de IGF-II, se añaden preferiblemente concentraciones apropiadas de glutatona reducida y oxidada al entorno celular para promover la formación del puente disulfuro. En el caso de que una proteína de fusión con puentes disulfuro sea soluble incompletamente, se trata cualquier material insoluble preferiblemente con un agente caotrópico tal como urea para solubilizar la proteína desnaturada y replegarla en un tampón con las concentraciones apropiadas de glutatona reducida y oxidada, u otros agentes oxidantes y reductores, para facilitar la formación de puentes disulfuro apropiados (Smith *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264** (16): 9314-21). Por ejemplo, se ha replegado IGF-I usando guanidina-HCl 6 M y el agente reductor tris(2-carboxietil)fosfina 0,1 M para la desnaturación y reducción de IGF-II (Yang *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274** (53): 37598-604). El replegado de proteínas fue logrado en tampón Tris-HCl 0,1M (pH 8,7) conteniendo glutatona oxidada 1 mM, glutatona reducida 10 mM, KCl 0,2M y EDTA 1 mM.

Expresión in vivo

Un ácido nucleico que codifica una enzima lisosómica puede ser proporcionado ventajosamente directamente a un paciente que sufra de una enfermedad, o puede ser proporcionado a una célula *ex vivo*, seguido por la administración de la célula viva al paciente. Los métodos de terapia génica *in vivo* conocidos en la técnica incluyen proporcionar ADN purificado (por ejemplo, tal como en plásmido), proporcionar el ADN en un vector viral o proporcionar el ADN en un liposoma u otra vesícula (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º. 5.827.703, que describe a vehículos de lípidos para el uso en terapia génica y la patente de EE.UU. N.º. 6.281.010, que proporciona vectores adenovirales útiles en terapia génica).

Los métodos para tratar la enfermedad implantando una célula que ha sido modificada para expresar una proteína recombinante son también conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º. 5.399.346, que describe métodos para introducir un ácido nucleico en una célula humana primaria para su introducción en un ser humano. Aunque el uso de células humanas para terapia *ex vivo* sea preferido en algunas realizaciones, pueden ser implantadas otras células tales como células bacterianas en el sistema vascular de un paciente, liberando continuamente a un agente terapéutico. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs. 4.309.776 y 5.704.910.

El reconocimiento de una proteína directamente en un compartimento subcelular tal como un lisosoma sin requerir una etapa de purificación puede ser llevado a cabo usando los métodos de la presente invención. Una proteína de fusión IGF-II puede ser expresada en un organismo parásito atenuado o simbiótico que sea administrado a un huésped. La proteína de fusión de IGF-II expresada es secretada por el organismo, incorporada por las células huésped y reconocida en sus lisosomas.

Las proteínas RLIG pueden ser proporcionadas *in situ* vía *Leishmania* viva secretando las proteínas en los lisosomas del macrófago infectado. A partir de este orgánulo, éste abandona la célula y es incorporado por las células adyacentes no del linaje del macrófago. Así, el marcador de RLIG y el agente terapéutico permanecen necesariamente intactos mientras que la proteína reside en el lisosoma del macrófago. En consecuencia, cuando las proteínas RLIG son expresadas *in situ*, preferiblemente son modificadas para asegurarse de la compatibilidad con el ambiente lisosómico. La β -glucuronidasa humana ("GUS" humana), una parte terapéutica ejemplar, normalmente sufre una división del péptido del extremo C-terminal en el lisosoma o durante el transporte al lisosoma (por ejemplo, entre los restos 633 y 634 en GUS). Así, cuando un constructo de GUS-RLIG deba ser expresado por *Leishmania* en un lisosoma macrófago, la GUS humana preferiblemente se modifica para dar la proteína resistente a la división, o los restos después del resto 633 preferiblemente son simplemente omitidos a partir de una proteína de fusión RLIG. Asimismo, IGF-II, una parte de reconocimiento ejemplar, preferiblemente se modifica para aumentar su resistencia a la proteólisis, o un péptido de unión mínimo (por ejemplo, como se identifica por expresión en fago o dos híbridos en levadura) es sustituido por el resto IGF-II tipo silvestre.

Administración

Los medicamentos diana descubiertos de acuerdo con la presente invención pueden ser administrados a un huésped mamífero por cualquier ruta. Así, cuando sea apropiado, la administración puede ser oral o parenteral, incluyendo las rutas de administración intravenosa e intraperitoneal. Además, la administración puede ser por inyecciones periódicas de un bolo del medicamento o puede ser hecha más continuamente por la administración intravenosa o intraperitoneal de un depósito que sea externo (por ejemplo, una bolsa i. v.). Los medicamentos de la presente invención pueden ser de calidad farmacéutica. Es decir, cumplen con las normas de pureza y control de calidad requeridas para la administración a seres humanos. También están dentro del significado intencionado, según se usa en este documento, las aplicaciones veterinarias.

Las formulaciones, tanto para el veterinario como para el uso médico humano, de los medicamentos de acuerdo con la presente invención típicamente incluyen tales medicamentos en asociación con su vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otro(s) ingrediente(s). El(los) vehículo(s) puede(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de las formulaciones y no deletéreos con su receptor. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en cuanto a esto, son requeridos para incluir alguno y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y agentes antimicóticos, agentes de retraso de absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Se conoce el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el compuesto activo, es contemplado su uso en las composiciones. También pueden ser incorporados en las composiciones compuestos activos suplementarios (identificados de acuerdo con la invención y/o conocidos en la técnica). Las formulaciones pueden ser presentadas convenientemente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de farmacia/microbiología. En general, algunas formulaciones se preparan poniendo al medicamento en asociación con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y luego, si fuera necesario, conformando el producto en la formulación deseada.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta pretendida de administración. Los ejemplos de rutas de administración incluyen la administración oral o parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, por inhalación, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolven-

tes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil-paraBen; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

5

Las soluciones útiles para la administración oral o parenteral pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica, descritas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (Gennaro, A.,ed.), Mack Pub., 1990. Las formulaciones para la administración parenteral también pueden incluir glicocolato para la administración bucal, metoxisalicilato para la administración rectal, o ácido cítrico para la administración vaginal. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. Los supositorios para la administración rectal también pueden ser preparados mezclando el fármaco con un excipiente no irritante tal como la mantequilla de cacao, otros glicéridos, u otras composiciones que sean sólidas a temperatura ambiente y líquida a la temperatura del cuerpo. Las formulaciones también pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como el polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y otros por el estilo. Las formulaciones para la administración directa pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad. Otros vehículos parenterales potencialmente útiles para estos medicamentos incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener como excipientes, por ejemplo, la lactosa, o soluciones acuosas que contengan, por ejemplo, éter de polioxietileno-9-laurilo, glicocolato y desoxicolato, o soluciones aceitosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel que se aplica por la nariz. Los enemas de retención también pueden ser usados para la administración rectal.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, cápsulas de gelatina, bolsitas, comprimidos, pastillas o píldoras, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del fármaco; en forma de un polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite-en-agua o una emulsión de agua-en-aceite. El medicamento también puede ser administrado en forma de un bolo, electuario o pasta. Un comprimido puede ser hecho comprimiendo o moldeando el fármaco opcionalmente con uno o varios ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados pueden ser preparados comprimiendo, en una máquina adecuada, el fármaco en una forma no aglomerada tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados por un aglomerante, lubricante, diluyente inerte, agente tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden ser hechos moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del fármaco pulverizado y el vehículo adecuado humedecido con un líquido diluyente inerte.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el objetivo de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser incorporado con excipientes. Las composiciones orales preparadas usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague incluye el compuesto en el vehículo fluido y se aplican oralmente y agitan y se expectoran o se tragan. Pueden ser incluidos como parte de la composición agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglomerante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente de desintegración tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de grano; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como hierbabuena, salicilato de metilo o condimento de naranja.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación inmediata de soluciones inyectables estériles o de dispersión. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL® (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y puede ser fluida a un grado que sea fácil que exista como inyectable. Puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y puede ser conservada contra la acción de la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser lograda por varios agentes antibacterianos y agentes antimicóticos, por ejemplo, paraBen, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y otros similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser causada por la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, cuando se requiera, seguido de la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de

ES 2 300 439 T3

preparación incluyen secado al vacío y liofilización que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de su solución antes filtrada en estéril.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración intra-articular pueden estar en forma de una preparación acuosa estéril del medicamento que puede estar en forma microcristalina, por ejemplo, en forma de una suspensión microcristalina acuosa. Formulaciones liposómicas o sistemas poliméricos biodegradables también pueden ser usados para presentar el medicamento tanto para la administración intraarticular como para la oftálmica.

10 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica, incluyendo el tratamiento oculares, incluyen preparativos líquidos o semilíquidos tales como linimentos, lociones, geles, aplicaciones, emulsiones de-aceite-en-agua o de-agua-en-aceite tales como cremas, ungüentos o pastas; o soluciones o suspensiones tales como gotas. Las formulaciones para la administración tópica en la superficie de la piel pueden ser preparadas dispersando el medicamento con un vehículo dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, ungüento o jabón. En algunas realizaciones, son útiles vehículos capaces de formar una película o capa sobre la piel para localizar la eliminación de la inhibición y la aplicación. Cuando sea deseada la adherencia a una superficie de tejido, la composición puede incluir el medicamento dispersado en una composición de fibrinógeno-trombina u otro bioadhesivo. El medicamento entonces puede ser extendido, pulverizado o aplicado de otra manera a la superficie del tejido deseado. Para la administración tópica a superficies de tejido interno, el agente puede ser dispersado en un adhesivo de tejido líquido u otra sustancia conocida para realzar la adsorción a una superficie de tejido. Por ejemplo, pueden ser usadas ventajosamente hidroxipropilcelulosa o soluciones de fibrinógeno/trombina. De forma alternativa, pueden ser usadas soluciones que revistan al tejido, tales como formulaciones que contienen pectina.

25 Para tratamientos por inhalación, tal como para el asma, puede ser usada la inhalación del polvo (formulaciones autopropulsadas o pulverizaciones) dispensada con un recipiente de pulverización, un nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones pueden estar en forma de un polvo pulverizado fino para la administración pulmonar de un dispositivo de inhalación en polvo o formulaciones autopropulsadas que dispensen el polvo. En el caso de una solución autopropulsada y formulaciones de pulverización, el efecto puede ser logrado tanto por la elección de una válvula que tenga las características de pulverización deseadas (es decir, siendo capaz de producir una pulverización que tenga el tamaño de partículas deseado) o incorporando el ingrediente activo como un polvo suspendido en el tamaño de partículas controlado. Para la administración por inhalación, también pueden ser administrados los medicamentos en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente a presión o dispensador que contenga a un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador. También pueden ser usadas gotas nasales.

30 La administración sistémica también puede ser por un medio transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, son usados en la formulación agentes penetrantes apropiados para que la barrera sea permeable. Se conocen tales agentes penetrantes generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales de bilis y derivados del ácido filisídico. La administración transmucosa puede ser logrado por el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los medicamentos típicamente se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas tales como las generalmente conocidas en la técnica.

35 En una realización, los medicamentos se preparan con vehículos que protegerán contra su eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulada. Pueden ser usados polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como el acetato de etilen-vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden ser obtenidos comercialmente de Corporación Alza y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden ser usadas suspensiones liposómicas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden ser preparadas de acuerdo con métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N°. 4.522.811. También pueden ser usados microsomas y micropartículas.

40 Pueden ser formuladas composiciones orales o parenterales en formas de de dosificación unitaria para su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La formas de dosificación unitaria se refieren a unidades físicamente discretas ajustadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se trate; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención es controlada y directamente dependiente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se logre, y las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de un tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

55 Generalmente, los medicamentos identificados de acuerdo con la invención pueden ser formulados para la administración parenteral u oral a seres humanos u otros mamíferos, por ejemplo, en cantidades terapéuticamente eficaces, por ejemplo, cantidades que proporcionen concentraciones apropiadas del fármaco al tejido diana durante un tiempo suficiente para inducir el efecto deseado. Además, los medicamentos de la presente invención pueden ser administrados solos o en combinación con otras moléculas conocidas para tener un efecto beneficioso sobre la enfermedad particular o la indicación de interés. Sólo de forma ilustrativa, cofactores útiles incluyen cofactores que alivian los síntomas, incluyendo agentes antisépticos, antibióticos, antivirales y antimicóticos y analgésicos y anestésicos.

La concentración eficaz de los medicamentos identificados de acuerdo con la invención que deben ser administrados en una composición terapéutica variarán dependiendo de un número de factores, incluyendo la dosificación final deseada del fármaco que se administre y la ruta de administración. La dosificación preferida para ser administrada también depende probablemente de variables tales como el tipo y el grado de la enfermedad o la indicación que sea tratada, el estado de salud global del paciente particular, la eficacia biológica relativa del medicamento suministrado, la formulación del medicamento, la presencia y los tipos de excipientes en la formulación y la ruta de administración. Los medicamentos de esta invención pueden ser proporcionados a un individuo usando unidades de dosis típicas deducidas de los estudios en mamíferos antes descritos usando a primates no humanos y roedores. Como se describe anteriormente, una unidad de dosificación se refiere a una forma unitaria, es decir, una dosis sola que puede administrarse a un paciente, y que puede ser manejada y embalada fácilmente, quedando como una dosis unitaria físicamente y biológicamente estable que comprenda el medicamento como tal o una mezcla de ello con diluyentes farmacéuticos sólidos o líquidos o vehículos.

En ciertas realizaciones, los organismos son modificados para producir los medicamentos identificados e acuerdo con la invención. Estos organismos pueden liberar el medicamento en su cultivo o pueden ser introducidos directamente a un paciente. En otra serie de realizaciones, pueden ser utilizadas células para servir como un vehículo de los medicamentos identificados de acuerdo con la invención.

Los medicamentos de la invención también incluyen los derivados de "profármaco". El término profármaco se refiere a un derivado farmacológicamente inactivo (o parcialmente inactivo) de una molécula parenteral que requiere una biotransformación espontánea o enzimática, dentro del organismo para liberar o activar el componente activo. Los profármacos son variaciones o derivados de los medicamentos de la invención que tienen grupos excindibles en condiciones metabólicas. Los profármacos se vuelven los medicamentos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*, cuando sufren solvolisis en condiciones fisiológicas o sufren la degradación enzimática. El profármaco de esta invención puede llamarse único, doble, triple, etcétera, dependiendo del número de etapas de biotransformación requeridas para liberar o activar el componente de fármaco activo dentro del organismo e indica el número de funcionalidades presentes en una forma precursora tipo. Las formas de profármaco a menudo ofrecen ventajas de solubilidad, compatibilidad con el tejido o liberación retrasada en el organismo mamífero (véase, Bundgard, "Design of Prodrugs", págs. 7-9,21-24, Elsevier, Amsterdam 1985 y Silverman, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", págs. 352-401, Academic Press, San Diego, Calif., 1992). Además, los derivados de profármaco de acuerdo con esta invención pueden ser combinados con otras propiedades para realzar la biodisponibilidad.

Ejemplos

Ejemplo 1

Constructos de RLIG

Se han sintetizado casetes de IGF-II por ligadura de una serie de oligos sobrelapantes y clonados en Pirl-SAT, un vector de expresión estándar de *Leishmania*. Se han hecho 4 casetes de IGF-II: uno que codifica el polipéptido maduro tipo silvestre, uno con una delección $\Delta 1-7$, uno con una mutación Y27L y uno con ambas mutaciones. Estas mutaciones, según se ha publicado, reducen la unión de IGF-II a otros receptores sin afectar a la unión del receptor de M6P.

La secuencia de codificación de IGF-II humana es mostrada en la Figura 1. La proteína es sintetizada como una pre-proteína con un péptido señal de 24 aminoácidos en el extremo amino-terminal y una región del extremo carboxi-terminal de 89 aminoácidos ambos de los cuales son eliminados después de la translación, revisado en (O'Dell *et al.* (1998) *Int. J. Biochem Cell Biol.* **30** (7): 767-71. La proteína madura tiene 67 aminoácidos. Una versión optimizada del codon de *Leishmania* de IGF-II maduro se muestra en la Figura 2 (Langford *et al.* (1992) *Exp. Parasitol* **74** (3): 360-1). Este casete fue construido templando los oligonucleótidos sobrelapantes cuyas secuencias se muestran en la Tabla 2. Casetes adicionales que contienen una delección de los aminoácidos 1-7 del polipéptido maduro ($\Delta 1-7$), la alteración del resto 27 de tirosina a leucina (Y27L) o ambas mutaciones ($\Delta 1-7$, Y27L) fueron hechas para producir los casetes de IGF-II con especificidad sólo para el receptor deseado como se describe antes. Para hacer el casete de IGF-II tipo silvestre, fueron hibridados y ligados los oligos RLIG1-9. Para hacer el casete Y27L, fueron hibridados y ligados los oligos 1, 12, 3, 4, 5, 16, 7, 8 y 9. Después de la ligadura, los dos casetes fueron purificados en columna. Los casetes Y27L y tipo silvestre fueron amplificados por PCR utilizando los oligos RLIG 20 y 10 y la plantilla apropiada. Para incorporar la delección $\Delta 1-7$, las dos plantillas fueron amplificadas usando los oligos RLIG 11 y 10. Los 4 casetes de IGF-II resultantes (tipo silvestre, Y27L, $\Delta 1-7$ e Y27L $\Delta 1-7$) fueron purificados en columna, fueron digeridos con XbaI, purificados por gel y ligados al corte de XbaI Pirl-SAT.

Los casetes génicos entonces fueron clonados entre el sitio XmaI (no mostrado) corriente arriba de XbaI en el vector y el sitio AscI de tal modo que se conservara el marco de lectura. Un sitio de metilasa de DAM sobrelapante en el sitio 3' XbaI permitió el uso del sitio 5' XbaI en vez del sitio XmaI para la clonación. El sitio AscI añade un puente de 3 restos de aminoácidos.

TABLA 3

Oligonucleotidos usados en la construcción de vectores Pir-RLIG

NOMBRE	SECUENCIA	POSICIÓN
RLIG 1	GCGGCGGCGAGCTGGTGGACACGCTGCAGTTGTTGCGGCGACCGCGGC	CADENA SUPERIOR 48-97
RLIG 2	TTCTACTTCAGCCGCGCCAGCCGCTGAGCCGCGCAGCCGCGGCAT	CADENA SUPERIOR 98-147
RLIG 3	CGTGGAGGAGTGCTGCTTCCGACGCTGCGACCTGGCGCTGCTGGAGACGT	CADENA SUPERIOR 148-197
RLIG 4	ACTGCGGACGCGCGGCGAAGTCCGAGTAAGATCTAGAGCG	CADENA SUPERIOR 198-237
RLIG 5	AGCGTGTCCACCAGCTCGCCGCGCACAGCGTCTCGCTCGGGCGGTACGC	INFERIOR 72-23
RLIG 6	GGCTGGCCGGCGGCTGAAGTAGAAGCCGCGGTGCGCGCACACGAACTGC	INFERIOR 122-73
RLIG 7	GCTGCGGAAGCAGCACTCCTCCACGATGCGCGGCTGCGGCGGCTCAOCC	INFERIOR 172-123
RLIG 8	CTCCGACTTCGCGCGCTGCGCAGTACGCTCCAGCAGCGCCAGGTGCA	INFERIOR 223-173
RLIG 9	CCGTCTAGAGCTGCGCGCGCGGTACCGCCGAGCGAGACGCTGT	CADENA SUPERIOR 1-47
RLIG 10	CGCTCTAGATCTTACTCCGACTTCG	INFERIOR 237-202
RLIG 11	CCGTCTAGAGCTGCGCGCGCGCTGTGCGGCGGCGAGCTGGTGGAC	SUPERIOR 1-67, Δ23-43
RLIG 12	TTCTGTTTCAGCCGCGCCAGCCGCTGAGCCGCGCAGCCGCGGCAT	SUPERIOR 98-147 (Y27L)
RLIG 16	GGCTGGCCGGCGGCTGAACAGGAAGCCGCGGTGCGCGCACACGAACTGC	INFERIOR 122-73 (Y27L)
RLIG 20	CCGTCTAGAGCTGCGCGCGCGGCG	CADENA SUPERIOR 1-25

El objetivo de incorporar las mutaciones indicadas en el casete del IGF-II es para asegurar que las proteínas de fusión son reconocidas en el receptor apropiado. La IGF-II humana tiene un alto grado de semejanza de secuencia y estructural con IGF-I (véase, por ejemplo la Figura 6) y las cadenas A y B de insulina (Terasawa *et al.* (1994) *Embo J.* **13** (23): 5590-7). Por consiguiente, no es sorprendente que estas hormonas tengan especificidades de unión del receptor sobrelapantes. La IGF-II se une al receptor de insulina, el receptor de IGF-I y el receptor de manosa 6-fosfato independiente catión/IGF-II (CIM6P/IGF-II). El receptor de CIM6P/IGF-II es un receptor de actividad dual que actúa como un receptor para IGF-II y como un receptor de manosa 6-fosfato implicado en la clasificación de hidrolasas lisosómicas. Durante varios años, estas dos actividades fueron atribuidas para separar proteínas hasta que fue determinado que ambas actividades residían en una proteína sola (Morgan *et al.* (1987) *Nature* **329** (6137): 301-7); (Tong *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* **263** (6):2585-8).

Los efectos biológicos más profundos de IGF-II, tal como su efecto mitogénico, son mediados por el receptor de IGF-I más que por el receptor de CIM6P/IGF-II, revisado en (Ludwig *et al.* (1995) *Trends in Cell Biology* **5**: 202-206) véase también (Korner *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (1): 287-95). Se piensa que el resultado principal de la unión de IGF-II al receptor de CIM6P/IGF-II es el transporte al lisosoma para su degradación subsecuente. Esto representa un medio importante para controlar los niveles de IGF-II y explica por qué los ratones que tienen mutantes nulos del receptor de CIM6P/IGF-II exhiben una mortalidad perinatal a no ser que IGF-II también sea suprimido (Lau *et al.* (1994) *Genes Dev.* **8** (24): 2953-63); (Wang *et al.* (1994) *Nature* **372** (6505): 464-7); (Ludwig *et al.* (1996) *Dev. Biol.* **177** (2):517-35). En los métodos de la presente invención, es deseable tener las proteínas de fusión IGF-II unidas al receptor de CIM6P/IGF-II. Las mutaciones Y27L y Δ1-7 reducen la unión de IGF-II a los receptores de IGF-I e insulina sin cambiar la afinidad del receptor de CIM6P/IGF-II (Sakano *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* **266** (31): 20626-35); (Hashimoto *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270** (30):18013-8). Por lo tanto, de acuerdo con la invención, estas formas mutantes de IGF-II deben proporcionar un medio para reconocer proteínas de fusión específicamente con el receptor de CIM6P/IGF-II.

En un experimento, son preparados 4 casetes diferentes de IGF-II con las secuencias apropiadas, tipo silvestre, Δ1-7, Y27L y Δ1-7/Y27L. Los casetes de β-GUS son fusionados a casetes de IGF-II y estos constructos son puestos dentro de parásitos. Los casetes de α-galactosidasa también son fusionados a los casetes de IGF-II. Las fusiones de GUS han sido analizadas y se ha mostrado que producen la proteína enzimáticamente activa.

Un constructo preferido, mostrado en la Figura 3, incluye el péptido señal de la fosfatasa ácida secretada de *L. mexicana*, SAP 1, clonada en el sitio XbaI de un Pirl-SAT modificado en el cual ha sido eliminado el sitio Sail simple. Fusionada en marco está la secuencia de GUS madura, unida a un marcador de IGF-II por un puente de tres aminoácidos.

Ejemplo 2

Preparación de la proteína RLIG

Fueron cultivadas *L. mexicana* que expresaban y secretaban β-Gus a 26°C en 100 ml de medio estándar Promastigote (M199 con HEPES 40 mM, pH 7,5, adenina 0,1 mM, 0,0005% de hemina, 0,0001% de biotina, suero bovino fetal del 5%, fluido embrionario del 5%, 50 unidades/ml de penicilina, 50 μg/ml de estreptomina y 50 μg/ml de nourseotricina). Después de alcanzar una densidad de aproximadamente 5 x 10⁶ promastigotes/ml, los promastigotes fueron recogidos por centrifugación durante 10 minutos a 1000 x g a temperatura ambiente; estos promastigotes fueron usados para inocular 1 litro de medio de proteína bajo (M199 suplementado con adenina 0,1 mM, 0,0001% de biotina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 μg/ml de estreptomina) a temperatura ambiente. Los cultivos de 1 litro fueron

introducidos en matraces taponados de 2 litros con una barra de agitación estéril de modo que los cultivos pudieran ser incubados a 26°C con una agitación suave. Fueron aireados los cultivos de 1 litro dos veces al día moviéndolos en una mampara de flujo laminar, eliminando los tapones y agitando enérgicamente antes de sustituir los tapones. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad de $2-3 \times 10^7$ promastigotes/ml, los cultivos fueron centrifugados como se describe anteriormente excepto el pelet de promastigote que fue desechado y el medio fue decantado en matraces estériles. La adición de 434 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro precipitó la proteína GUS activa a partir del medio; el medio desalado fue almacenado a 4°C de la noche a la mañana. Las proteínas precipitadas fueron recolectadas por centrifugación a 10.500 x g durante 30 minutos o por filtración a través de una membrana Supor-800 de Gelman; las proteínas fueron resuspendidas en Tris 10 mM, pH 8,1, CaCl_2 mM y fueron almacenadas a -80°C hasta la diálisis. Los preparativos a granel de varios litros de medio fueron descongelados, reunidos, colocados en un tubo de diálisis (Spectra/Por-7, MWCO 25,000), y fueron dializados de la noche a la mañana frente a dos volúmenes de 1 litro de DMEM con bicarbonato (medio Eagle modificado de Dulbecco).

Ejemplo 3

Ensayo de respuesta de RLIG

La línea de fibroblastos de la piel GM4668 (humano, NIGMS, depósito de células mutantes genético humanas) es derivada a partir de un paciente con mucopolisacaridosis VII; las células por lo tanto tienen poca o ninguna actividad de β -GUS. Las células GM4668 son por lo tanto particularmente útiles para analizar la respuesta de los constructos de GUS-RLIG en células humanas. Fueron cultivadas células GM4668 en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de becerro fetal del 15% (v/v) a 37°C en 5% de CO_2 . Fueron cultivados fibroblastos de la noche a la mañana en presencia de aproximadamente 150 unidades de los preparativos de β -glucuronidasa humana expresada en *Leishmania* (GUS), la proteína de fusión GUS-IGF-II (GUS-RLIG), o la proteína de fusión GUS-IGF-II mutante (GUS Δ -RLIG) preparados como se describe en el Ejemplo 2. Los pocillos de control no contenían ninguna enzima añadida (blanco medio DMEM). Después de la incubación, el medio fue eliminado de los pocillos y analizado por triplicado para detectar la actividad de GUS. Los pocillos fueron lavados cinco veces con 1 ml de solución salina tamponada de fosfato a 37°C, luego fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente en 0,2 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, hidrocloreuro de fluoruro de 4-(2-aminoetilbencenosulfonilo) 2 mM (AEBSF, Sigma) y NP-40 del 1%). Los lisados celulares fueron transferidos a tubos de microcentrífuga, luego se hicieron girar a 13.000 revoluciones por minuto durante 5 minutos para eliminar los restos de células. Tres alícuotas de 10 μL de lisado fueron analizadas para calcular la concentración de proteína (ensayo de proteínas Micro BCA de Pierce, Pierce, IL).

Tres alícuotas de 38 μL de lisado fueron analizadas para detectar la actividad de GUS usando un ensayo fluorométrico estándar adaptado de (Wolfe *et al.* (1996) "Protocols for Gene Transfer in Neuroscience: Towards Gene Therapy of Neurological Disorders" 263-274). Los ensayos se hacen en cuvetas de fluorímetro disponibles. 150 μl de la mezcla de reacción son añadidos a cada cuveta. 1 ml de la mezcla de reacción es una mezcla de sustrato de 860 μg de H_2O , 100 μl de NaAcetato 1 M, 40 μl de 25X β -GUS. La mezcla de sustrato de 25X β -GUS es una suspensión de 250 mg de 4-metilumbeliferil- β -D glucurónido en 4,55 ml de etanol almacenado a -20°C en un desecador. 38 μl de la muestra son añadidos a la mezcla de reacción y la reacción se incuba a 37°C. Las reacciones son terminadas por la adición de 2 ml de solución de parada (10,6 g de Na_2CO_3 , 12,01 g de glicina, H_2O hasta 500 ml, pH 10,5). El resultado de fluorescencia es después medido con el fluorímetro.

Los resultados del experimento de respuesta indican que la cantidad de células asociadas a GUS-RLIG es 10 veces mayor que la del GUS no modificado (Figura 4). El constructo mutante doble es aproximadamente 5 veces más eficaz que el GUS no modificado. Estos resultados indican que la tecnología RLIG es un medio eficaz para reconocer una enzima lisosómica por su respuesta. La respuesta también puede ser verificada usando técnicas de inmunofluorescencia estándar.

Ejemplo 4

Experimentos competitivos

Para verificar que la respuesta mediada por RLIG ocurre vía el sitio de unión de IGF-II sobre el receptor de M6P independiente de cationes, fueron realizados experimentos competitivos usando IGF-II recombinante. El diseño experimental era idéntico al descrito anteriormente, excepto que los fibroblastos GM4668 fueron incubados con las proteínas indicadas en suero menos DMEM +2%BSA durante aproximadamente 18 horas. Cada derivado de β -GUS fue añadido en 150 U por pocillo. Fueron añadidos 2,85 μg de IGF-II a cada pocillo para analizar la competitividad. Esto representa aproximadamente 100 veces de exceso molar respecto a RLIG-GUS, una concentración suficiente para competir por unirse al receptor de M6P/IGF-II.

Los resultados del experimento competitivo son representados en la Figura 5. En ausencia de IGF-II, fueron detectadas más de 24 unidades/mg de lisado de RLIG-GUS. Bajo la adición de IGF-II, la cantidad de células asociadas a RLIG-GUS cayó a 5,4 U. Este nivel es similar al nivel de GUS no modificado incorporado por los fibroblastos. Así, la mayor parte de la respuesta de la proteína RLIG puede competir por IGF-II indicando que la respuesta ocurre en realidad por una interacción ligando-receptor específica.

Ejemplo 5

Expresión del producto génico en medio libre de suero

5 También pueden ser aislados productos de expresión a partir del medio libre de suero. En general, la cepa de expresión es cultivada en medio con suero, diluida en medio libre de suero, y se le permite crecer durante varias generaciones, preferiblemente 2-5 generaciones, antes de que el producto de expresión sea aislado. Por ejemplo, la producción de proteínas terapéuticas diana secretadas puede ser aislada a partir de promastigotes de *Leishmania mexicana* que son cultivados inicialmente en 50 ml de medio 1X M199 en un matraz de 75 cm² a 27°C. Cuando la densidad celular alcanza 1-3 x 10⁷/ml, el cultivo es usado para inocular 1,2 L de medio M199. Cuando la densidad de este cultivo alcanza aproximadamente 5 x 10⁶/ml, las células son recolectadas por centrifugación, resuspendidas en 180 ml de sobrenadante y usadas para inocular 12 L de medio "Zima" en un matraz de centrífuga de 16 L. La densidad celular inicial de este cultivo es típicamente aproximadamente 5 x 10⁵/ml. Este cultivo es aumentado hasta una densidad celular de aproximadamente 1,0-1,7 x 10⁷ células/ml. Cuando esta densidad celular es alcanzada, las células son separadas del medio de cultivo por centrifugación y el sobrenadante es filtrado a 4°C mediante un filtro de 0,2 µ para eliminar los promastigotes residuales. El medio filtrado fue concentrado de 12,0 L a 500 ml utilizando un dispositivo de filtración de flujo tangencial (cartucho Prep/Scale-TFF de MILLIPORE).

El medio de crecimiento preferido para este método es el medio de crecimiento M199 y "Zima". Sin embargo, también son útiles otros que contengan suero y sin suero. El medio de crecimiento M199 es como sigue: (lote de 1L) = 200 ml de 5X M199 (con indicador de pH rojo de fenol) + 637 ml de H₂O, 50,0 ml de FBS, 50,0 ml de EF, 20,0 ml de 50 microgramos/ml de SAT, 2,0 ml de hemina del 0,25% en trietanolamina del 50%, 10 ml de adenina 10 mM en Hepes 50 mM, pH 7,5, 40,0 ml de Hepes 1 M, pH 7,5, 1 ml de biotina del 0,1% en etanol del 95%, 10,0 ml de penicilina/estreptomocina. Todos los sueros usados son inactivados por calor. El volumen final = 1 L es esterilizado con filtro. El medio M199 modificado con "Zima" es como sigue: (lote de 20,0 L) = 217,8 g de polvo M199 (-)rojo de fenol + 7,0 g de bicarbonato de sodio, 200,0 ml de adenina 10 mM en Hepes 50 mM, pH 7,5, 800,0 ml de Hepes sin ácido, pH 7,5, 20,0 ml de biotina del 0,1% en etanol del 95%, 200,0 ml de penicilina/estreptomocina, volumen final = 20,0 L es esterilizado con filtro.

Las proteínas terapéuticas diana son purificadas preferiblemente por cromatografía con Concanavalina A (ConA). Por ejemplo, cuando un cultivo alcanza una densidad de > 1,0 x 10⁷ promastigotes/ml, la *L. mexicana* es eliminada por centrifugación, 10 minutos a 500 x g. El medio de cultivo recolectado es pasado por un filtro de 0,2 µm para eliminar partículas antes de la carga directamente en una columna de ConA-agarosa (agarosa en perlas 4% reticulado, Sigma). La columna de ConA-agarosa es pretratada con NaCl 1 M, Tris 20 mM, pH 7,4, 5 mM cada uno de CaCl₂, MgCl₂ y MnCl₂ y luego es equilibrada con 5 volúmenes de tampón de columna (Tris 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM y MnCl₂ 1 mM). Un total de 179.800 unidades (nmol/h) de actividad de GUS (en 2 L) en el medio de cultivo son cargadas en 22 ml de la columna de agarosa de ConA. Ninguna actividad es detectable en el flujo a través o en el lavado. La actividad de GUS es eluida con tampón de columna conteniendo metilmanopiranosido 200 mM. Las fracciones eluidas que contienen el pico de actividad son reunidas y concentradas. Los experimentos de respuesta y competitivos fueron realizados como se describe en los Ejemplos 3 y 4, pero los organismos fueron cultivados en medio sin suero y purificados con ConA; aproximadamente 350-600 unidades enzimáticas fueron aplicadas a los fibroblastos. Se muestran los resultados en la Figura 7.

Ejemplo 6

Experimentos competitivos usando IGF-II desnaturalizado como competidor

El experimento en el Ejemplo 4 es repetido usando IGF-II normal o desnaturalizado como competidor. Como en el Ejemplo 4, se reduce la cantidad de GUS-RLIG asociado por célula cuando se co-incuba con concentraciones normales de IGF-II que son eficaces para la competición, pero, a concentraciones comparables, IGF-II desnaturalizado tiene poco o ningún efecto.

Ejemplo 7

Respuesta de unión y experimentos de semivida

La unión de proteínas GUS-RLIG al receptor de M6P/IGF-II sobre fibroblastos es medida y la velocidad de respuesta es evaluada de modo similar a los métodos publicados (York *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274** (2): 1164-71). Los fibroblastos de GM4668 cultivados en placas de cultivo de 12 pocillos como se describe anteriormente son lavados en medio helado menos suero que contiene 1% de BSA. El ligando, (GUS, GUS-RLIG o GUS-ΔRLIG, o proteínas de control) es añadido a las células en medio frío menos suero más 1% de BSA. Bajo la adición del ligando, las placas son incubadas en hielo durante 30 minutos. Después de 30 minutos, el ligando es eliminado y las células son lavadas rápidamente 5 veces con medio frío en hielo. Los pocillos para el punto de tiempo 0 reciben 1 ml de tampón de separación frío en hielo (ácido acético 0,2 M, pH 3,5, NaCl 0,5 M). La placa entonces es puesta a flote en un baño maría a 37°C y son añadidos 0,5 ml de medio precalentado para iniciar la respuesta. En cada punto de parada, es añadido 1 ml de tampón de separación. Cuando el experimento es terminado, las alícuotas del tampón de separación son guardadas para el ensayo fluorométrico de la actividad de β-glucuronidasa como se describe en el Ejemplo 3. Las

ES 2 300 439 T3

células entonces son lisadas como se describe anteriormente y el lisado es analizado para determinar la actividad de β -glucuronidasa.

5 Se espera que GUS-RLIG sea rápidamente incorporado por los fibroblastos en materia de minutos una vez que la temperatura es cambiada a 37°C (York *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274** (2): 1164-71) y que la actividad de la enzima persista en las células durante muchas horas.

Ejemplo 8

10 *Terapia in vivo*

Son usados ratones GUS menos generados por acoplamiento heterocigóticos de ratones B6.C-H-2^{bml}/ByBIR-gus^{mps}/+ (Birkenmeier *et al.* (1989) *J. Clin. Invest* **83** (4): 1258-6) para evaluar la eficacia de GUS-RLIG o derivados en terapia de reemplazo enzimático. Dos formatos son usados. En un formato, se dan a 3-4 animales una inyección sola de 20.000 U de enzima en 100 μ l de tampón de dilución de enzima (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,5). Los ratones son sacrificados 72-96 horas más tarde para evaluar la eficacia de la terapia. En un segundo formato, se dan a ratones inyecciones semanales de 20.000 unidades aproximadamente 3-4 semanas y son sacrificados 1 semana después de la inyección final. Son llevados a cabo análisis histoquímicos e histopatológicos de hígado, bazo y cerebro por métodos publicados (Birkenmeier *et al.* (1991) *Blood* **78** (11): 3081-92); (Sands *et al.* (1994) *J. Clin. Invest* **93** (6):2324-31); (Daly *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (5): 2296-300). En ausencia de terapia, las células (por ejemplo, macrófagos y células Kupffer) de ratones GUS menos desarrollaron grandes compartimentos de almacenaje intracelulares que son el resultado de la acumulación de productos superfluos en los lisosomas. Es previsto que en células en ratones tratados con los constructos de GUS-RLIG, visiblemente se reducirá el tamaño de estos compartimentos o los compartimentos se encogerán hasta que no sean más visibles con un microscopio óptico.

25 Asimismo, seres humanos con enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosómico serán tratados usando constructos que reconocen una parte terapéutica apropiada en sus lisosomas. En algunos casos, el tratamiento tomará la forma de inyecciones regulares (por ejemplo, semanales) de una proteína RLIG. En otros casos, el tratamiento será logrado por la administración de un ácido nucleico para permitir la expresión persistente *in vivo* de una proteína RLIG, o por la administración de una célula (por ejemplo, una célula humana o un organismo unicelular) que exprese la proteína RLIG en el paciente. Por ejemplo, la proteína RLIG puede ser expresada *in situ* usando un vector de *Leishmania* como se describe en la patente de EE.UU. N°. 6.020.144, publicada el 1 de febrero de 2000; solicitud de patente provisional de EE.UU. N°. 60/250.446; y registro de agente de la solicitud provisional N°. SYM-005PRA, "Protozoan Expression Systems for Lysosomal Storage Disease Genes", presentada el 11 de mayo de 2001.

35 Ejemplo 9

El objetivo de estos experimentos es evaluar la eficacia de α -galactosidasa modificada con RLIG (α -GAL A) como una terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Fabry.

40 La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosómico que es el resultado de una actividad insuficiente de α -GAL A, la enzima responsable de eliminar la galactosa terminal de GL-3 y otros esfingolípidos neutros. La menor actividad enzimática ocurre debido a una variedad de mutaciones sentido y antisentido en el gen ligado a X. La acumulación de GL-3 es más frecuente en los lisosomas de las células endoteliales vasculares del corazón, hígado, riñones, piel y cerebro, pero también ocurre en otras células y tejidos. La acumulación de GL-3 en células endoteliales vasculares en última instancia conduce a problemas cardíacos y fallos hepáticos.

50 La terapia de reemplazo enzimático es un tratamiento eficaz para la enfermedad de Fabry, y su éxito depende de la capacidad de la enzima terapéutica a ser incorporada por los lisosomas de las células en las cuales GL-3 se acumula. El producto de Genzyme, Fabrazyme, es una α -GAL A recombinante producida en células CHO DUKX B11 que han sido aprobadas para el tratamiento de pacientes con Fabry en Europa debido a su eficacia demostrada.

55 La capacidad de la Fabrazyme para ser incorporado por células y ser transportado al lisosoma es debida a la presencia de manosa 6-fosfato (M6P) en su carbohidrato N-unido. Fabrazyme es suministrado a los lisosomas por la unión al receptor de manosa-6-fosfato/IGF-II (M6P/IGF-Iir), presente sobre la superficie celular de la mayor parte de tipos de células, y la posterior endocitosis mediada por el receptor. Fabrazyme, según se cree, tiene tres sitios de glicosilación N-unidos en los restos ASN 108,161 y 184. Los carbohidratos predominantes en estas posiciones son complejo bisialilasa biantenarico fucosilasa, manosa-7 oligomanosa monofosforilada, y manosa-7 oligomanosa bifosforilada, respectivamente.

60 La tecnología de reconocimiento lisosómico independiente de la glicosilación (RLIG) de la presente invención reconoce directamente proteínas terapéuticas en el lisosoma vía una interacción diferente con M6P/IGF-Iir. Un ligando de reconocimiento es un derivado de IGF-II maduro humano, que también se une con alta afinidad al M6P/IGF-Iir. En las aplicaciones actuales, el marcador IGF-II es proporcionado como una fusión del extremo C-terminal a la proteína terapéutica, aunque otras configuraciones sean factibles incluyendo la reticulación. La capacidad de enzimas RLIG-modificadas para responder en células ha sido establecida usando β -glucuronidasa RLIG-modificada, que es incorporada de manera eficiente por los fibroblastos en un procedimiento que es competido con exceso de IGF-II. Las ventajas de la modificación de RLIG son mayores unión al receptor de M6P/IGF-II, mayor respuesta en lisosomas de

ES 2 300 439 T3

células diana, farmacocinética cambiada o mejorada y un mayor, diferente o mejorado grado de distribución en tejidos. El mejor grado de distribución en tejidos podría incluir la administración de α -GAL A RLIG-modificado a través de la barrera sangre-cerebro ya que las proteínas IGF cruzan de forma demostrable la barrera sangre-cerebro.

- 5 Otra ventaja del sistema RLIG es la capacidad de producir proteínas competentes en su repuesta en sistemas de expresión no mamíferos donde no ocurren modificaciones con M6P. En ciertas realizaciones, la proteína RLIG-modificada será producida principalmente en células CHO. En ciertas otras, el marcador RLIG será colocado en el extremo C-terminal de α -GAL A aunque la invención no esté así limitada.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una medicamento diana que comprende una enzima lisosómica y un péptido que se une a un dominio extracelular de un receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato-, en el que el péptido:
- (a) tiene una identidad de secuencia de aminoácidos suficiente respecto a IGF-II humano tal que el péptido se une al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes; o
 - 10 (b) comprende IGF-II o un dominio variable de anticuerpo que reconoce el receptor; o
 - (c) comprende la secuencia de aminoácidos de IGF-I o de una muteína de IGF-I en la que: (i) los aminoácidos 55 y 56 son cambiados; o (ii) los aminoácidos 1-4 son suprimidos o cambiados; o (iii) los aminoácidos 55 y 56 son cambiados y los aminoácidos 1-4 son suprimidos o cambiados.
- 15 2. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos 60% idéntica respecto a IGF-II humano.
- 20 3. El medicamento diana de la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos comprende, en las posiciones correspondiente a las posiciones 54 y 55 de IGF-II humano, aminoácidos cada uno de los cuales no están cargados o están negativamente cargados a pH 7,4.
- 25 4. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende los aminoácidos 48-55 de IGF-II humano.
5. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende al menos tres aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en los aminoácidos 8, 48, 49, 50, 54 y 55 de IGF-II humano.
- 30 6. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende los aminoácidos 8-23 de IGF-II humano y los aminoácidos 41-61 de IGF-II humano.
7. El medicamento diana de la reivindicación 6, en el que los aminoácidos 8-28 y 41-81 están presentes en un polipéptido solo.
- 35 8. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende los aminoácidos 41-61 de IGF-II humano y una muteína de los aminoácidos 8-28 de IGF-II humano, diferenciándose la muteína de la IGF-H humana en una posición seleccionada a partir del grupo que consiste en el aminoácido 9, aminoácido 19, aminoácido 26 y aminoácido 27.
- 40 9. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido comprende un polipéptido que tiene hélices alfa antiparalelas separadas por no más de cinco aminoácidos.
- 45 10. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido se une a un dominio extracelular del receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes e (i) no se une a una muteína en la cual el aminoácido 1572 del receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes es cambiado de isoleucina a treonina; o (ii) se une a la muteína con una constante de disociación al menos diez veces la constante de disociación para unir el dominio extracelular del receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes.
- 50 11. El medicamento diana de la reivindicación 1, en el que el péptido es capaz de unirse a un dominio del receptor que consiste esencialmente en las repeticiones 10-15 del receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes.
- 55 12. El medicamento diana de la reivindicación 11, en el que el péptido es capaz de unirse a un dominio del receptor que consiste esencialmente en las repeticiones 10-13 de dicho receptor.
13. El medicamento diana de la reivindicación 12, en el que el péptido se une a un dominio del receptor que consiste esencialmente en las repeticiones 11-12 de dicho receptor.
- 60 14. El medicamento diana de la reivindicación 13, en el que el péptido se une a un dominio del receptor que consiste esencialmente en la repetición 11 de dicho receptor.
15. El medicamento diana de la reivindicación 14, en el que el péptido se une a un dominio del receptor que consiste esencialmente en los aminoácidos 1508-1566 de dicho receptor.
- 65 16. El medicamento diana de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en terapia de reemplazo enzimático.
17. El uso del medicamento diana de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

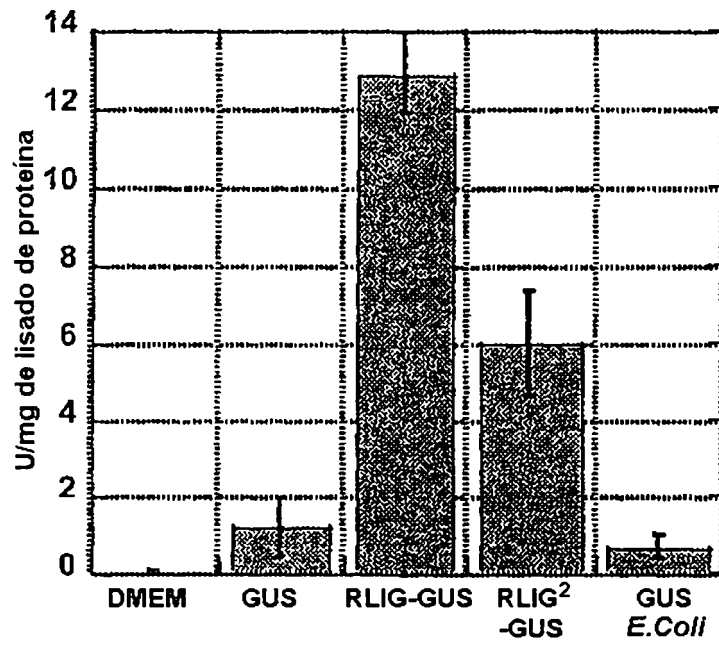


Figura 4

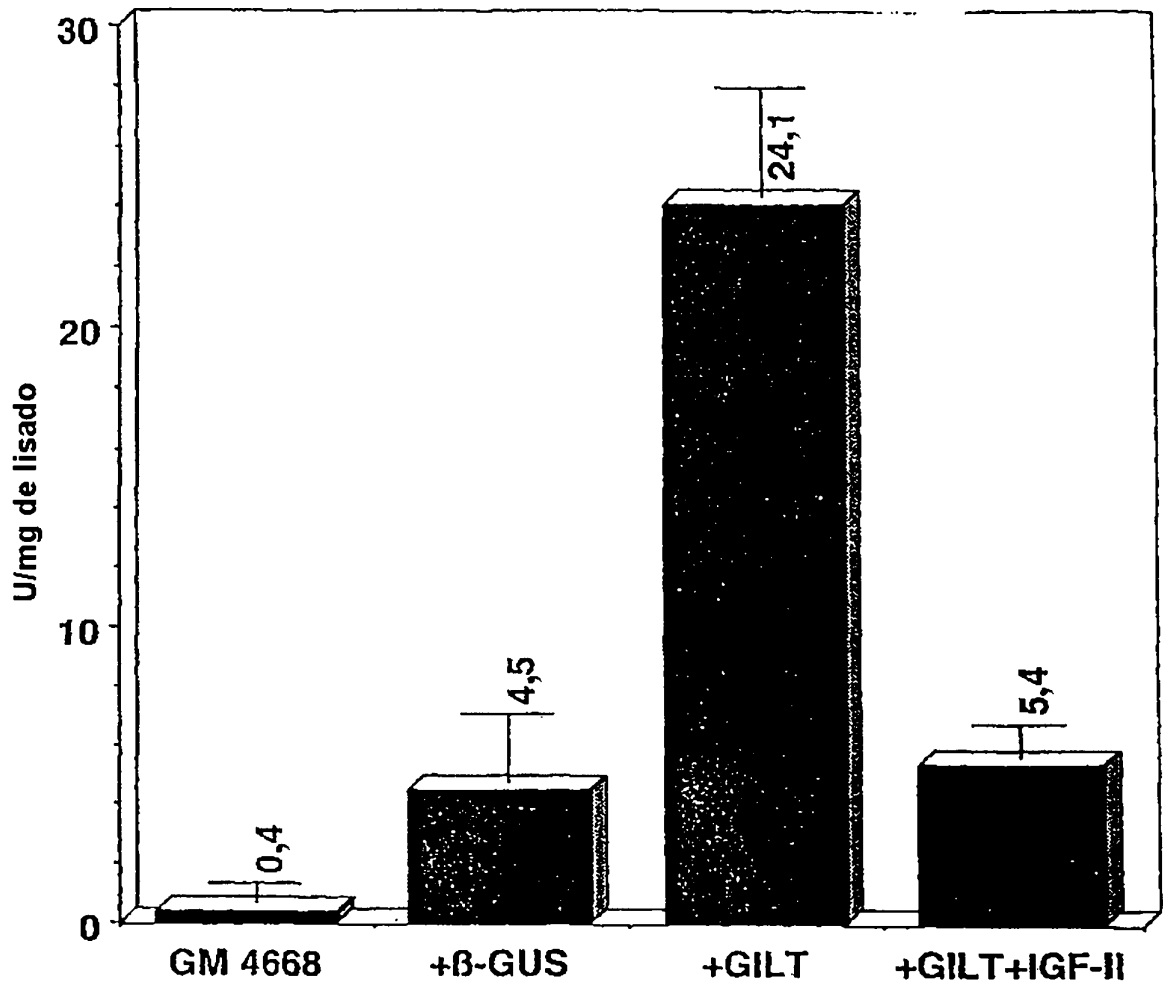


Figura 5

Figura 6. Alineamiento de proteínas maduras IGF-I y IGF-II mostrándose la localización de los dominios

