

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 783**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016** **PCT/EP2016/055830**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016** **WO16146760**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016** **E 16714275 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021** **EP 3271453**

54 Título: **Proteínas lisosómicas glucosiladas, método de producción y utilizaciones**

30 Prioridad:

17.03.2015 EP 15159443

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

14.03.2022

73 Titular/es:

ELEVA GMBH (100.0%)
Hans-Bunte-Straße 19
Hans-Bunte-Straße 19, DE

72 Inventor/es:

DABROWSKA-SCHLEPP, PAULINA;
BENJAMIN, FODE;
BUSCH, ANDREAS;
NIEDERKRÜGER, HOLGER y
SCHAAF, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 899 783 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas lisosómicas glucosiladas, método de producción y utilizaciones

- 5 La presente invención se refiere al campo de la expresión de proteínas recombinantes en plantas para la obtención de una glucosilación modificada en comparación con los sistemas de expresión de mamíferos.

Antecedentes

- 10 Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) son un grupo de trastornos hereditarios potencialmente letales; la mayoría de ellos está causada por la deficiencia de un único enzima o proteína lisosómico, que conduce a la acumulación anormal de sustrato en las células. Actualmente, la terapia de sustitución enzimática (ERT) es el único tratamiento específico disponible para varias LSD. En estas enfermedades, el almacenamiento lisosómico puede eliminarse en muchos tejidos diana mediante infusión intravenosa del enzima faltante. Tradicionalmente, los enzimas recombinantes utilizados en la ERT se producen en células de mamífero en cultivo. Por ejemplo la
15 patente US nº 6.083.725 describe una α -galactosidasa de células humanas. Recientemente, como enfoque alternativo, se han utilizado sistemas de expresión vegetales para producir enzimas lisosómicas para el uso terapéutico (Shaaltiel *et al.*, Plant Biotechnol. J. 5:579-590, 2007; Du *et al.*, J. Lipid Res. 49:1646-1657, 2008; De Marchis *et al.*, Plant Biotechnol. J. 9:1061-1073, 2011; He *et al.*, Nat. Commun. 3:1062, 2012). Respecto a los
20 sistemas basados en células de mamífero, los sistemas vegetales presentan varias ventajas, entre ellas los costes de producción más bajos, la eliminación del riesgo de contaminación por patógenos de mamífero y, en el caso de los musgos, una manipulación relativamente más fácil de la ruta de N-glucosilación. Sin embargo, una cuestión importante de los enzimas producidos en células vegetales para ERT es que sus estructuras de N-glicano difieren de los enzimas producidos en células de mamífero. Particularmente, los enzimas lisosómicos expresados en
25 células vegetales típicamente no adquieren la modificación de manosa 6-fosfato (M6P) en los residuos de manosa terminal sin una fosforilación artificial adicional. Las cadenas de sacáridos ejercen un papel fundamental en la ERT. Los enzimas lisosómicos administrados por vía intravenosa son asimilados por los tejidos mediante receptores de superficie celular que reconocen la estructura de carbohidrato de los enzimas. El receptor de M6P (M6PR) y el receptor de manosa (RM) representan dos contribuyentes importantes para este sistema de asimilación.

- 30 La mayoría de enzimas lisosómicos portan residuos de M6P. Se cree generalmente que en la ERT para la mayoría de LSD, la ruta endocítica mediada por M6PR resulta crucial para un suministro suficiente de enzima (Sly *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:15172-15177, 2006; Sands *et al.*, J. Biol. Chem. 276:43160-43165, 2001). Por el contrario, el RM se encuentra presente sobre los macrófagos y se cree que facilita únicamente el efecto terapéutico de la ERT dirigida a sustituir el enzima en dichas células.

Los documentos WO 02/08404 y WO 2012/098537 describen la producción de diversos enzimas lisosómicos en el tabaco.

- 40 El documento WO 03/073839 describe la producción de enzimas lisosómicos en semillas de plantas, especialmente en semillas de plantas del tabaco.

La patente US nº 7.011.831 describe la producción de enzimas lisosómicos con una compleja glucosilación de N-glicanos en las células de insecto.

- 45 El documento WO 2008/132743 describe la producción de enzimas lisosómicos glucosilados de alto contenido de manosa en el tabaco mediante la utilización de un constructo de expresión con péptido de señal de ER y una señal de reconocimiento vacuolar.

- 50 El documento EP 2 789 686 A1 describe la modificación de las rutas de glucosilación vegetales para producir glicanos fosforilados de tipo mamífero.

El documento US 2006/040353 describe la transferencia de beta-galactosa a glicanos unidos mediante N. Se sugieren glucoproteínas con manosa-6-fosfato para el tratamiento de enfermedades lisosómicas.

- 55 Chiba *et al.* han producido α -gal A humana a partir de la levadura *S. cerevisiae* (Chiba *et al.*, Glycobiology 12:821-828, 2002). En ese caso, M6P está cubierta por manosa terminal y la eliminación de los residuos de manosa por la α -manosidasa bacteriana condujo a una incorporación dependiente de M6PR mejorada del enzima en fibroblastos en cultivo. Recientemente, se ha expresado α -gal A en otra cepa de levadura de genes manipulados, que sobreexpresa MNN4, un regulador positivo de la manosilfosfato transferasa (Tsukimura *et al.*, Mol. Med. 18:76-82, 2012). El contenido de N-glicano fosforilado en dicha preparación de α -gal A era más elevado que en agalsidasa alfa (28,7% frente a 15,3%). La inyección repetida de dicho enzima en ratones Fabry dio como resultado una
60 reducción similar de Gb₃ cardíaca y renal a la observada en ratones inyectados con agalsidasa alfa. Más recientemente, Kizhner *et al.* han informado de la purificación y caracterización de α -gal A humana producida a partir de un cultivo de células del tabaco (Kizhner *et al.*, Mol. Genet. Metab. 114(2):259-267, 2015). Al igual que
65 otros enzimas lisosómicos artificiales, dicho α Gal no está fosforilado. Sin embargo, esta proteína se encuentra

químicamente entrecruzada y PEGilada. Estas modificaciones están asociadas a cambios significativos en las características de la proteína, entre ellas una estabilidad *in vitro* incrementada y una semivida en circulación drásticamente prolongada (~10 h) en comparación con la agalsidasa alfa o beta. El mecanismo de asimilación de dicho enzima sigue siendo desconocido. Sin embargo, una eliminación plasmática notablemente lenta sugiere que la asimilación no se produce mediante endocitosis mediada por M6PR o RM.

La patente US nº 6.887.696 describe un método para la expresión de dos proteínas lisosómicas: la alfa-glucocerebrosidasa y la alfa-galactosidasa, en plantas del tabaco, una planta superior. Las proteínas lisosómicas producidas en tabaco presentaban un patrón de glucosilación diverso, con cantidades elevadas de N-glicanos complejos, especialmente GnMXF, MGnXF, GnGnXF, GnMx y MGnX.

El objetivo de la invención es proporcionar una fuente alternativa para la producción de proteínas lisosómicas, que son activas como terapéuticos para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico que requieren una glucosilación adecuada.

Sumario de la invención

Dicho objetivo de la presente invención resulta resuelto por la presente invención, que se basa en los inesperados resultados de que: i) las glucosilaciones paucimanosídicas en proteínas lisosómicas permiten que resulten adecuadas para opciones de tratamiento, y ii) que dichas glucosilaciones paucimanosídicas pueden obtenerse fácilmente en sistemas de expresión de briófitos.

La presente invención proporciona un método de preparación de una composición de proteína lisosómica que comprende la expresión de un transgén codificante de una proteína lisosómica en una planta o célula de briófito ("bryophyte plant or cell"), en la que dicha proteína lisosómica se expresa con una señal secretora N-terminal, en la que dicha señal secretora se elimina opcionalmente durante el procesamiento intracelular, y en la que la proteína lisosómica no presenta una señal vacuolar C-terminal con la secuencia VDTM (SEC ID nº 1) y no presenta una señal de retención de ER C-terminal con la secuencia KDEL (SEC ID nº 2), y dicho método comprende además la obtención de una proteína lisosómica expresada a partir de dicha planta o célula. La invención proporciona, además, una composición de proteína lisosómica obtenible mediante el método inventivo.

La invención proporciona, además, una composición de proteína lisosómica que comprende una pluralidad de proteínas lisosómicas que están glucosiladas de manera diversa según un patrón de glucosilación, en la que dicho patrón de glucosilación presenta por lo menos 45% de N-glicanos paucimanosídicos (% molar). Dicha composición de proteína puede obtenerse mediante el método inventivo.

Se proporciona además un método de procesamiento de una proteína lisosómica que comprende un N-glicano complejo, en el que dicho método comprende proporcionar la proteína lisosómica en una muestra y poner en contacto la muestra con un enzima HEXO de briófito, preferentemente HEXO3, de manera que el enzima HEXO de briófito escinde los residuos de GlcNAc terminales respecto de la proteína lisosómica, produciendo de esta manera un N-glicano paucimanosídico. El enzima HEXO puede encontrarse en una célula, especialmente una célula vegetal. Las proteínas lisosómicas pueden proporcionarse en forma de un medicamento o en una composición farmacéutica.

La invención proporciona además una planta o célula de briófito que resulta adecuada para llevar a cabo el método inventivo que comprende dicho transgén codificante de una proteína lisosómica.

La invención se refiere además a una composición de proteína lisosómica según la invención para la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómica que comprende administrar una composición de proteína lisosómica según la invención en un paciente en necesidad de tratamiento.

La totalidad de dichos aspectos están interrelacionados, forman igualmente parte de la totalidad de la invención proporcionada en la presente memoria y formas de realización preferidas de la invención en cualquier combinación puede estar relacionadas con cualquiera de dichos aspectos, por ejemplo, pueden proporcionarse o utilizarse plantas o células transformadas con un constructo o método dado para la producción de cualquier proteína lisosómica que debe glucosilarse según la invención. La descripción detallada siguiente de cualquier forma de realización o característica preferida se refiere a todos los aspectos igualmente. Por ejemplo, una característica de producto de la proteína lisosómica se refiere a que el método se selecciona para producir dicha proteína lisosómica con su característica de producto. Una descripción de etapas particulares del método es igualmente descriptiva de la proteína modificada mediante dichas etapas del método. La célula inventiva se transforma a fin de facilitar cualquier método inventivo de preparación en la célula. Todas las proteínas lisosómicas pueden utilizarse en los métodos inventivos de utilización (terapéutica o no terapéutica) de la proteína lisosómica. La presente invención se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) son un grupo de aproximadamente 50 trastornos metabólicos hereditarios que resultan de defectos en el funcionamiento lisosómico. Los lisosomas son responsables de la digestión de diversas moléculas, en la que participan varios enzimas cruciales. En el caso de que uno de estos enzimas sea defectuoso, debido a una mutación, las moléculas grandes se acumulan dentro de la célula, eventualmente matándola. Los trastornos de almacenamiento lisosómico están causados por una disfunción lisosómica, habitualmente como consecuencia de la deficiencia en un único enzima necesario para el metabolismo de los lípidos, glucoproteínas o mucopolisacáridos.

El tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico es principalmente sintomático, y la terapia de sustitución enzimática es la más común. La ERT requiere la administración de proteínas lisosómicas activas en las células mediante una ruta de incorporación.

Tradicionalmente, los enzimas recombinantes utilizados en la ERT se producen en células de mamífero en cultivo. Recientemente, como enfoque alternativo, se han utilizado sistemas de expresión vegetales para producir enzimas lisosómicos para la utilización terapéutica. Respecto a los sistemas de células de mamífero, los sistemas vegetales poseen varias ventajas, entre ellas los menores costes de producción, la eliminación del riesgo de contaminación por patógenos de mamífero y, en el caso de los musgos, una manipulación relativamente más sencilla de la ruta de N-glucosilación. Sin embargo, una cuestión importante al considerar la utilización de enzimas producidos por células vegetales para la ERT son sus estructuras de N-glicano, que difieren de los enzimas producidos por las células de mamífero. Particularmente, los enzimas lisosómicos expresados en las células vegetales típicamente no adquieren la modificación de manosa 6-fosfato (M6P) en los residuos de manosa terminales.

La presente invención proporciona un nuevo método de producción de proteínas lisosómicas transgénicas en células vegetales, especialmente en células de briófito, que inesperadamente ha conducido a la formación de glucoproteínas con un grado elevado de glucosilación paucimanosídica, es decir, una glucosilación que termina con unos cuantos, por ejemplo, 2 residuos de manosa, en una estructura ramificada -Man<(Man)₂. Se ha demostrado que estas estructuras resultan altamente eficaces para la incorporación, especialmente en células afectadas por una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Esta glucosilación alterada no es natural para las proteínas lisosómicas, aunque inesperadamente las proteínas alteradas todavía resultan ser proteínas terapéuticas muy eficaces.

La proteína lisosómica utilizada en el método inventivo es un transgén, por ejemplo, de origen de mamífero, para la utilización en la ERT en ese mamífero de origen. Estas proteínas lisosómicas transgénicas producidas en briófitos pueden utilizarse como proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. De esta manera, las proteínas lisosómicas son enzimas activas una vez administradas, en particular son activas bajo condiciones presentes en un lisosoma, tales como un pH de aproximadamente 5. Evidentemente resultan posibles formas de almacenamiento inactivas, por ejemplo, liofilizadas. La glucosilación paucimanosídica inventiva no interfiere sustancialmente con la actividad enzimática, aunque media en la incorporación y estabilidad de las proteínas lisosómicas. Inesperadamente, los N-glicanos inventivos en las proteínas lisosómicas conducen a una eficacia elevada, permitiendo un uso terapéutico de las mismas, especialmente en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico.

La presente invención puede basarse en métodos conocidos de introducción de transgenes en briófitos. Se han desarrollado sistemas de transformación adecuados para el aprovechamiento biotecnológico de los briófitos para la producción de proteínas heterólogas. Por ejemplo, se han llevado a cabo transformaciones con éxito mediante transferencia de ADN directa en tejido de protonema mediante la utilización de pistolas génicas. Asimismo se ha conseguido la transferencia de ADN mediada por PEG en protoplastos de musgo. El método de transformación mediada por PEG se ha descrito muchas veces para *Physcomitrella patens* y conduce tanto a transformantes transitorios como estables (K. Reutter y R. Reski, Pl. Tissue culture and Biotech. 2:142-147, 1996). Además, puede llevarse a cabo la transformación sin marcadores mediante un método de transformación mediada por PEG asimismo con briófitos (Stemmer C., Koch A. y Gorr G., 2004, Moss 2004, The 7th Annual Moss International Conference, Freiburg, Alemania) y puede utilizarse para la introducción posterior de múltiples secuencias de nucleótidos.

Se conoce a partir de la técnica anterior información detallada sobre el cultivo de briófitos que resultan adecuados para la utilización en la invención, tales como *Leptobryum pyriforme* y *Sphagnum magellanicum*, en biorreactores (E. Wilbert, "Biotechnological studies concerning the mass culture of mosses with particular consideration of the arachidonic acid metabolism", tesis de doctorado, University of Mainz, 1991; H. Rudolph y S. Rasmussen, Crypt. Bot. 3:67-73, 1992). Resulta especialmente preferida en el contexto de la presente invención la utilización de *Physcomitrella patens*, ya que las técnicas de biología molecular se aplican en este organismo (R. Reski Bot. Acta, 111, páginas 1 a 15, 1998). Para el cultivo de briófitos, pueden utilizarse medios con complementos (Baur *et al.*, Plant Biotechnol. J. 3:331-340, 2005) o sin complementos, tales como elementos traza (Weise *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 70:337-345, 2006).

El método inventivo de preparación de una composición de proteína lisosómica preferentemente comprende expresar un transgén codificante de una proteína lisosómica en una planta o célula de briófito, en la que dicha proteína lisosómica se expresa con una señal secretora N-terminal y la proteína lisosómica no presenta una señal vacuolar C-terminal con la secuencia VDTM (SEC ID nº 1). Lo anterior evitaría el transporte dirigido a vacuolas, que conduciría al almacenamiento de la proteína lisosómica en vacuolas (en lugar de la excreción) y potencialmente a un procesamiento diferente del glicol en la vacuola, en la que todavía son posible en cierta medida las glucoformas paucimanosídicas. En el Golgi, sin transporte dirigido a vacuolas, basándose en la interacción de proteínas recombinantes específica de los briófitos, una ruta de glucosilación diferente inesperadamente condujo a cantidades elevadas de glucosilación paucimanosídica independiente del procesamiento vacuolar. Lo anterior resulta muy inesperado, ya que en el tabaco la ruta no vacuolar secretora condujo a la formación de N-glicanos predominantemente complejos en lugar de a glucosilación paucimanosídica (documento US6887696). Aparentemente, los briofitos presentan un reconocimiento único de las proteínas lisosómicas que conduce a dicha modificación.

La SEC ID nº 1 es una señal de transporte dirigido a vacuolas vegetal C-terminal que conduce a un transporte dirigido a vacuolas eficiente. En algunas formas de realización, pueden encontrarse presentes otras señales de transporte dirigido a vacuolas, especialmente señales no vegetales, que conducen a un transporte dirigido a vacuolar menos eficiente y a algo de expresión posteriormente en la ruta secretora que evita las vacuolas. Sin embargo, en las formas de realización más preferidas, no se encuentra presente ninguna señal de transporte dirigido a vacuolas durante la expresión o ni siquiera en el producto obtenido final. Las señales vacuolares asimismo pueden eliminarse artificialmente después de obtener la proteína a partir de las células.

Los N-glicanos paucimanosídicos están basados en el recorte de los N-glicanos complejos. En el Golgi, la GlcNAc terminal se elimina de los glicanos complejos, dejando una manosa terminal; en el caso del sistema de briófito, lo anterior resulta muy eficiente, dejando una manosa terminal en ambas ramas del N-glicano (anteriormente complejo).

Según la invención, se utiliza una secuencia de señal secretora, habitualmente en el extremo N de la secuencia de aminoácidos. La señal secretora N-terminal asimismo se denomina péptido de tráfico o secuencia de señal del RE. Es parte de la secuencia de aminoácidos codificada y expresada. La señal secretora conduce a la expresión directamente en RE de la célula, fijando las rutas para la secreción (o a un destino vacuolar en el caso de que se encuentre presente una señal vacuolar). La señal secretora habitualmente resulta eliminada intrínsecamente de la secuencia de aminoácidos de la proteína durante la expresión. Éste es un proceso natural en la célula vegetal. Para permitir la localización apropiada del producto de expresión de los transgenes, los genes de las proteínas lisosómicas pueden modificarse para permitir la localización en la célula vegetal. Preferentemente se utilizan secuencias de ácidos nucleicos híbridas en los constructos para la transformación de las plantas o células vegetales. Los dominios relevantes para la localización de, por ejemplo, los enzimas de mamífero, se sustituyen por secuencias vegetales a fin de conseguir la localización y tráfico celular correctos, tal como en el RE y/o Golgi en la planta. Un ejemplo de una señal secretora vegetal es la SEC ID nº 5, aunque puede utilizarse cualquier otra señal secretora vegetal. Puede ser una secuencia endógena a la especie de briófito utilizada o puede ser una secuencia vegetal foránea, aunque preferentemente es una secuencia de briófito.

El método inventivo incluye la expresión de la proteína lisosómica sin una señal vacuolar vegetal (de briófito), que presenta la secuencia VDTM (SEC ID nº 1). Lo anterior conduce a una ruta de expresión desde el RE hasta el Golgi y eventualmente a la secreción, evitando la localización terminal en una vacuola. En los briófitos, la secreción puede ser directamente al medio de cultivo. En otras plantas puede ser un compartimiento apoplástico de la célula vegetal. Inesperadamente, incluso sin la localización vacuolar, pudo conseguirse un grado elevado de glucosilación paucimanosídico mediante el método inventivo.

Como etapa final, a continuación, se obtiene la proteína lisosómica expresada a partir de dicha planta o célula. Con este fin, la proteína lisosómica puede recogerse de un procedimiento de extracción a partir de las células, que puede ser disruptivo o no disruptivo. Preferentemente, la proteína lisosómica expresada se obtiene a partir de materia secretada de la planta o célula, por ejemplo a partir del medio de cultivo, preferentemente sin interrupción de las células o plantas productoras. A continuación, la proteína lisosómica obtenida puede purificarse, por ejemplo, hasta una concentración de por lo menos 80% (m/v), preferentemente de por lo menos 90% (p/v), especialmente preferentemente de por lo menos 95% (m/v) o de por lo menos 98% (m/v) o de por lo menos 99% (m/v).

Preferentemente, la planta o célula de briófito es un musgo, preferentemente *P. patens*, planta o célula. El briófito puede ser cualquier briófito, aunque preferentemente se selecciona de entre musgo, hepática o antocerota, especialmente preferentemente de la clase Bryopsida o de los géneros *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*, *Ceratodon*, *Marchantia* y *Sphaerocarpos*. *Physcomitrella patens* es un sistema particularmente preferido, ya que presenta una frecuencia elevada de recombinación homóloga.

La materia objeto de la invención son plantas y células vegetales. La expresión "célula vegetal" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una célula aislada, a una célula singularizada, aunque asimismo a una célula en un tejido vegetal o de un tejido vegetal, preferentemente un tejido seleccionado de entre callo, protonema,

floema, xilema, mesófilo, tronco, hojas, talo, cloronema, caulonema, rizoide o gametóforo, o una célula en un organismo vegetal. La célula puede ser una célula de protoplasto. En formas de realización preferidas, las células vegetales aisladas o incluso los tejidos vegetales se transforman según la invención y después crecen hasta formar plantas o tejidos vegetales, o siguen siendo cultivos de células vegetales, tales como un cultivo en suspensión, por ejemplo, un biorreactor (Hohe y Reski, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:307-311, 2005).

La proteína lisosómica además no presenta una señal C-terminal de retención de ER con la secuencia KDEL (SEC ID nº 2). Las señales de retención de ER conducen a una retención en RE o en el sistema de Golgi. Lo anterior puede presentar un profundo impacto sobre el patrón de glucosilación observado en la proteína expresada, ya que la glucosilación es un proceso competitivo con varios enzimas glucosilantes que compiten por las proteínas de sustrato que deben modificarse. Aunque se esperaría que el recorte paucimanosídico beneficiase la retención de ER, inesperadamente las proteínas lisosómicas inventivas se expresaron con cantidades elevadas de N-glicanos paucimanosídicos sin dicha (o ninguna) señal de retención de ER.

La SEC ID nº 2 es una señal C-terminal de retención de ER que conduce a una retención eficiente en el RE o en el Golgi. Además, el motivo dilisina (KXKX) C-terminal preferido, asimismo responsable de la retención de ER en cierta medida, asimismo falta. En algunas formas de realización, pueden encontrarse presentes otras señales de retención de ER, especialmente señales no vegetales, que conducen a una retención menos eficiente en RE/Golgi y a un procesamiento de compartimiento a compartimiento hacia la secreción. Sin embargo, en formas de realización más preferidas, no se encuentra presente ninguna señal de retención de ER durante la expresión o incluso en el producto obtenido final. Las señales de retención de ER asimismo pueden eliminarse artificialmente después de la obtención de la proteína a partir de las células.

Resulta especialmente preferido para cualquier forma de realización de la presente invención, que la proteína lisosómica no presente una secuencia de señal de retención de ER C-terminal vegetal y una secuencia de señal vacuolar C-terminal vegetal; resulta especialmente preferido que no presente cualquier secuencia de señal C-terminal de retención de ER y cualquier secuencia de señal C-terminal vacuolar. Las señales vegetales son de origen vegetal y se encuentran en plantas, especialmente briófitos. Son funcionales en los briófitos. Tal como se ha explicado anteriormente, la retención de ER no resulta necesaria e incluso el procesamiento vacuolar no resulta necesario para la elevada glucosilación paucimanosídica en los sistemas de expresión de briófito inventivos.

Preferentemente, la proteína lisosómica comprende una secuencia de aminoácidos expresada que termina en el extremo C con los aminoácidos de una proteína lisosómica nativa o un truncamiento de la misma. Lo anterior significa que no se encuentran presentes adiciones en la secuencia de las proteínas. Son posibles los truncamientos, aunque no resultan preferidos. Evidentemente, los truncamientos no afectan sustancialmente la actividad de la proteína lisosómica inventiva, que todavía es un requisito tal como se ha explicado anteriormente. La actividad enzimática puede reducirse, por ejemplo hasta en 20% en comparación con la proteína lisosómica nativa bajo condiciones lisosómicas en una célula de mamífero, especialmente humana, tal como a un pH de 5. Los truncamientos pueden ser una delección de como máximo 50, preferentemente de como máximo 40, como máximo 30, como máximo 20, como máximo 10, como máximo 5 o uno, o cualquier intervalo entre dichos valores (por ejemplo, 1 a 10, etc.) aminoácidos C-terminales de la proteína lisosómica nativa. Es conocido que las alfa-galactosidasas truncadas son activas con dichos truncamientos, tal como se indica, por ejemplo, en el documento US 6.887.696 B2.

Preferentemente, la planta o célula de briófita comprende o no comprende un transgén de HEXO3. HEXO3 es un enzima que se encuentra naturalmente en las plantas. Puede proporcionarse (o no) en forma de un transgén para incrementar todavía adicionalmente la actividad de HEXO3. Las introducciones de transgenes pueden resultar facilitadas por los mismos métodos mediante los que el transgén de proteína lisosómica resulta incorporado en la planta o célula, por ejemplo, mediante hibridación recombinante genómica o la introducción de un plásmido. Se afirma que HEXO3 es responsable de algo de glucosilación paucimanosídica en el apoplasto de recubrimiento de la membrana plasmática de las plantas (Liebminger *et al.*, *J. Biol. Chem.* 286:10793-10802, 2011; Bosch *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* 19(31):5503-12, 2013); sin embargo, la actividad de HEXO observada por Liebminger en *Arabidopsis thaliana* no puede explicar la elevada glucosilación paucimanosídica observada en briófitos. El enzima relacionado, HEXO1, es responsable de algo de glucosilación paucimanosídica vacuolar y HEXO2 aparentemente presenta poca actividad en *Arabidopsis*. Puede observarse una actividad más elevada o una mejor accesibilidad en los briófitos.

Aparentemente, HEXO de briófitos presenta una actividad particularmente alta sobre las proteínas lisosómicas. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método *in vitro* de procesamiento de una proteína lisosómica que comprende un N-glicano complejo, en el que dicho método comprende proporcionar la proteína lisosómica en una muestra y poner en contacto la muestra con un enzima HEXO de briófito, preferentemente HEXO3, de manera que el enzima HEXO de briófito escinde los residuos de GlcNAc terminales respecto de la proteína lisosómica, produciendo de esta manera un N-glicano paucimanosídico. Esencialmente, la ruta de glucosilación de la proteína lisosómica nativa presente en los briófitos asimismo puede llevarse a cabo fuera de la célula de briófita, especialmente *in vitro* con enzimas HEXO aislados, o en otra célula, preferentemente una célula vegetal mediante la sustitución en dicha planta de un enzima HEXO activo procedente de un briófito, especialmente un musgo, tal

como *P. patens*. Esta planta puede ser un no briófito, por ejemplo, una planta superior, o un briófito, para incrementar la carga génica de HEXO, preferentemente de HEXO3, tal como se ha detallado anteriormente.

Preferentemente, la planta o célula de briófito tiene suprimida o eliminada la alfa1,3-fucosiltransferasa y/o la beta-1,2-xilosiltransferasa. Dichos enzimas vegetales pueden presentar una actividad o concentración reducida, por lo menos en el sitio de su actividad natural, tal como el Golgi. Los enzimas que preferentemente se eliminan son la alfa-1,3-fucosiltransferasa y/o la beta-1,2-xilosiltransferasa, tal como se indica en el documento WO 2004/057002. De esta manera, según una forma de realización preferida, dicha célula vegetal además presenta una actividad reducida, preferentemente una pérdida completa de función, de alfa-1,3-fucosiltransferasa y/o de beta-1,2-xilosiltransferasa, en particular mediante inactivación, de manera especialmente preferida mediante interrupción del gen codificante de alfa-1,3-fucosiltransferasa y/o de beta-1,2-xilosiltransferasa, preferentemente por un gen de entre cualquiera de las proteínas expresadas recombinantemente. Esta medida impide la formación de glucosilaciones de tipo vegetal que pueden ser inmunogénicas en un mamífero, tal como un ser humano.

Se proporciona además una célula o planta de briófito adecuada para llevar a cabo dicho método. La célula o planta comprende un transgén codificante de una proteína lisosómica tal como se ha indicado para el método alternativo y opcionalmente cualquier modificación o transgén adicional tal como se ha indicado anteriormente.

La presente invención proporciona además una composición de proteína lisosómica obtenible mediante cualquier método de preparación indicado en la presente memoria. La proteína lisosómica puede presentar cualesquiera características tales como las producidas mediante un método o variante preferidos o forma de realización tal como se ha indicado anteriormente. La proteína lisosómica habitualmente se obtiene en una pluralidad de dichas proteínas lisosómicas, con el patrón de glucosilación lisosómica inventivo observado en briófitos en las proteínas lisosómicas (transgénicas).

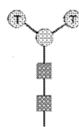
Especialmente, la invención proporciona una composición de proteína lisosómica que comprende una pluralidad de proteínas lisosómicas que potencialmente se encuentran glucosilados diversamente según un patrón de glucosilación, en la que dicho patrón de glucosilación presenta por lo menos 45%, preferentemente por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65% o por lo menos 70% de N-glicanos paucimanosídicos.

Todos los valores de porcentaje proporcionados en la presente memoria son porcentajes molares, excepto cuando se indique lo contrario.

Una pluralidad se refiere a una preparación que comprende proteínas inventivas, es decir, no proteínas individualizadas, sino una preparación macroscópica de dichas proteínas tal como se obtiene a partir de células o plantas, que comprende más de una proteína lisosómica al expresarse. La preparación puede presentar por lo menos 1000 moléculas de proteína, resultan especialmente preferidas por lo menos 100.000 moléculas o por lo menos 1 millón de moléculas.

Preferentemente, la proteína lisosómica de la composición o producida o utilizada mediante los métodos inventivos o en los métodos inventivos es una seleccionada de entre α -galactosidasa, preferentemente α -galactosidasa A (GLA), β -glucoceramidasa, β -glucosidasa (glucocerebrosidasa), α -manosidasa, aspartilglucosaminidasa, β -manosidasa, ceramidasa ácida, α -fucosidasa, β -galactosidasa, proteína activadora de β -hexosaminidasa, galactocerebrosidasa, galactoceramidasa, lipasa ácida lisosómica (LAL), α -iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, glucosamina-N-sulfatasa, heparán-sulfatosulfamidasa (SGSH), α -N-acetil-glucosaminidasa (NAGLU), (heparán) α -glucosaminidasa-N-acetiltransferasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, neuraminidasa, esfingomielinasa, esfingomielina fosfodiesterasa, ácido alfa-1,4-glucosidasa, β -hexosaminidasa o su subunidad α , alfa-N-acetilgalactosaminidasa (NAGA), α -galactosaminidasa, β -hexosaminidasa A, galactosa-6-sulfato sulfatasa e hialuronidasa. Resulta especialmente preferido en todas las formas de realización de la invención es α -galactosidasa. Una α -galactosidasa preferida es la α -galactosidasa humana, por ejemplo, de SEC ID nº 3, que puede expresarse a partir de la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 3, que puede expresarse a partir de la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 4, o una α -galactosidasa truncada de las mismas. Asimismo resulta preferida una glucocerebrosidasa, por ejemplo, glucocerebrosidasa humana, por ejemplo, de SEC ID nº 6, que puede expresarse a partir de la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 7. Asimismo resulta preferida la alfa-glucosidasa, por ejemplo, alfa-glucosidasa humana, por ejemplo, de SEC ID nº 8, que puede expresarse a partir de la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID nº 9. En otras formas de realización, la glucocerebrosidasa y la alfa-glucosidasa están excluidas del grupo de proteínas lisosómicas según la invención.

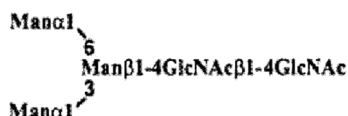
Preferentemente, las proteínas lisosómicas presentan uno o más N-glicanos paucimanosídicos que comprenden la estructura de fórmula 1:



(fórmula 1)

en la que un cuadrado representa N-acetilglucosamina (GlcNAc), un círculo representa manosa (Man) y un círculo con una T representa una manosa terminal. Dicha fórmula 1, asimismo denominada en la presente memoria, glicano "MM", representa una estructura nuclear que puede modificarse adicionalmente: en los N-glicanos paucimanosídicos dicha modificación adicional asimismo resulta posible con la condición de que las T-manosas sigan siendo terminales, es decir, se encuentren en los extremos no reductores de las cadenas sacáridas. Las manosas terminales pueden estar metiladas, especialmente O-metiladas. Son modificaciones comunes aquellas en las que una o más de las subunidades de GlcNAc o Man pueden encontrarse α 1,3-fucosiladas, α 1,6-fucosiladas y/o β 1,2-xilosiladas. Las α 1,3-fucosilaciones y α 1,6-fucosilaciones se observan comúnmente en la GlcNAc reductora. Habitualmente se observa una β 1,2-xilosilación en la manosa no terminal (círculo sin T en la fórmula 1). Según la invención, preferentemente una α 1,3-fucosilación y/o β 1,2-xilosilación se evita o se reduce debido a la inhibición de los enzimas respectivos durante la preparación, tal como se ha indicado anteriormente. Puede encontrarse presente o no α 1,6-fucosilación. No es habitual en plantas, aunque puede llevarse a cabo mediante la introducción de una α 1,6-fucosiltransferasa en la célula o planta expresante. Preferentemente, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% o por lo menos 95% de los N-glicanos de las proteínas lisosómicas de las composiciones inventivas comprenden o consisten en la estructura de fórmula 1 (% molar).

Una estructura de N-glicano paucimanosídico de la invención asimismo puede representarse mediante la fórmula (2):



(fórmula 2)

La fórmula 2 muestra además el tipo de conectividad de las subunidades de carbohidrato. La GlcNAc a la derecha está unida a la secuencia de aminoácidos de la proteína lisosómica. Los extremos reductor y no reductor de un oligosacárido convencionalmente se representan con el residuo monosacárido de extremo reductor más a la derecha y el extremo no reductor más a la izquierda (tal como en, por ejemplo, la fórmula 2). Debe observarse que la GlcNAc reductora se muestra a la izquierda en las fórmulas cortas proporcionadas en la presente memoria, tal como -GlcNAc₂-Man₃. En un N-glicano, la -GlcNAc reductora está unida a una asparagina en la cadena de aminoácidos de la proteína lisosómica. Lo anterior se indica mediante el símbolo "-" a la izquierda, que es un enlace con el residuo de Asn. En las glucoformas paucimanosídicas, hay dos extremos de manosa no reductores (izquierda en la fórmula 2, arriba en la fórmula 1).

La fórmula (2) es el núcleo común de la mayoría de N-glicanos, incluyendo los N-glicanos ricos en manosa y los N-glicanos complejos (ver Rayon *et al.*, J. Exp. Botany 49(326):1463-1472, 1998). En el caso de las estructuras paucimanosídicas, tanto la Man superior como la inferior a la izquierda tal como se muestran en la fórmula (2) son terminales, mientras que en los N-glicanos ricos en manosa y complejos por lo menos una Man contiene un enlace adicional a otra Man o GlcNAc. La α 1,3-gucosilación, α 1,6-fucosilación y/o β 1,2-xilosilación de dicho núcleo son opcionales. La α 1,3-fucosilación y la β 1,2-xilosilación son comunes en plantas, a menos que los enzimas respectivos se encuentren inhibidos (por ejemplo, tal como se muestra en el documento WO 2004/057002 o en Cox *et al.*, Nature Biotechnology 24(12):1591-7, 2006).

En el caso de que las proteínas lisosómicas expresadas presenten un contenido en glicanos MGn (una N-acetilglucosamina terminal adicional en una Man terminal, tal como se muestra en la fórmula 2) o glicanos GG (una N-acetilglucosamina terminal adicional en cada Man terminal, tal como se muestra en la fórmula 2), dichos glicanos MGn o GG pueden convertirse en las estructuras de la fórmula 1 o 2 mediante el tratamiento con beta-N-acetilglucosaminidasa. El tratamiento de beta-N-acetilglucosaminidasa puede llevarse a cabo mediante cualquier proteína lisosómica producida por un musgo, a fin de incrementar los glicanos paucimanosídicos. La α -galactosidasa A expresada en musgo habitualmente no requiere beta-N-acetilglucosaminidasa, ya que los glicanos paucimanosídicos se encuentran naturalmente en concentraciones elevadas. Según las condiciones de cultivo, la glucocerebrosidasa y alfa-glucosidasa producidas por musgo en ocasiones requieren el tratamiento con beta-N-acetilglucosaminidasa. Entre otros métodos para crear las proteínas lisosómicas glucosiladas inventivas se incluyen la expresión en insectos o células de insecto, tales como las células Sf9, la expresión en células de

levadura glucomanipuladas y la expresión en un musgo con una señal de transporte dirigido vacuolar (aunque resulta menos preferido, ya que la señal puede ser inmunógena en un paciente mamífero). Cualquier referencia en la presente memoria a proteínas lisosómicas "producidas en un musgo" o "producidas en un briófito" se refieren a los productos obtenibles mediante la producción en un musgo, es decir, que presentan los N-glicanos paucimanosídicos inventivos en cantidades elevadas tal como se indica en la presente memoria, con independencia del método de preparación utilizado. Puede seleccionarse cualquier método de preparación para producir los productos inventivos y "producido en un musgo" o "producido en un briófito" asimismo se refiere a dichos productos en métodos de producción no en un musgo. La expresión "producido en un musgo" o "producido en un briófito" se utiliza para expresar el patrón de glucosilación único, que se ha observado en los musgos y se define en la presente memoria particularmente, por ejemplo, en las reivindicaciones de producto y en la descripción de dichos productos en la presente memoria.

Una característica única de la N-glucosilación en briófitos de las proteínas lisosómicas según el método inventivo es la presencia de hexosas metiladas (Hex), preferentemente manosa metilada (Man) en los N-glicanos inventivos. Dichas manosas metiladas, en caso de ser terminales, no interfieren en la incorporación de las proteínas lisosómicas inventivas e incluso pueden potenciarla. Preferentemente, el patrón de glucosilación de la composición inventiva presenta por lo menos 1%, más preferentemente por lo menos 2%, por lo menos 3% o por lo menos 4% de N-glicanos de fórmula $\text{GlcNAc}_2\text{-Hex}_2\text{-metil-Hex}$, en la que Hex preferentemente es manosa (% molar). Según el método inventivo, la metilación habitualmente es una metilación de un oxígeno de la manosa, en particular una 2-O-metilación. Estas son metilaciones preferidas de las proteínas lisosómicas inventivas de la composición. Preferentemente, por lo menos 1%, más preferentemente por lo menos 2%, por lo menos 3% o por lo menos 4% de los N-glicanos de la composición presentan una metilación, especialmente una O-metilación, por ejemplo, 2-O-metilación (% molar). Preferentemente, en dichos N-glicanos metilados, únicamente uno de las por lo menos dos manosas terminales (no reductoras) se encuentra metilado.

Preferentemente, el patrón de glucosilación comprende los N-glicanos siguientes:

- i) 0% a 35%, preferentemente 0.5% a 30%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-(Man}_2\text{metil-Hex)}$,
- ii) 30% a 80%, preferentemente 40% a 70%, especialmente preferentemente 45% a 60%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3$,
- iii) 0% a 30%, preferentemente 4% a 22%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-GlcNAc}$,
- iv) 0% a 15%, preferentemente 2% a 12%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-GlcNAc}_2$,
- v) 0% a 5%, preferentemente 0% a 3%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-Hex}_2$,
- vi) 0% a 11%, preferentemente 1% a 8%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-Hex}_3$,
- vii) 0% a 10%, preferentemente 1% a 7%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-Hex}_4$,
- viii) 0% a 10%, preferentemente 1% a 7%, $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3\text{-Hex}_5$,

en los que la totalidad de dichos compuestos juntos constituyen 100% o menos de 100%, lo que resulta evidente por sí mismo (todos los % son % molares). Resulta posible menos de 100% ya que pueden encontrarse presentes otros N-glicanos, no especificados en el listado anterior. Dichos otros N-glicanos puede constituir entre 0% y 30%, preferentemente entre 0.01% y 20%, especialmente preferentemente entre 0.1% y 10%. Cualquiera de los N-glicanos especificados, i) a viii), puede encontrarse en una cantidad de por lo menos 0.01%, en lugar de 0%. GlcNAc es una subunidad de N-acetilglucosamina; Man es una subunidad de manosa; Hex es una subunidad de hexosa; metil-Hex es una subunidad de hexosa metilada, preferentemente 2-O-metil-hexosa. En dicho patrón de glucosilación, $\text{-GlcNAc}_2\text{-(Man}_2\text{metil-Hex)}$ y $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3$ juntos constituyen por lo menos 45% (% molar), es decir, son N-glicanos paucimanosídicos que contribuyen a dicha cantidad tal como se indica en el sumario de la invención. Una Hex especialmente preferida es Man en cualquiera de los N-glicanos anteriormente indicados i) a viii). La GlcNAc en el extremo reductor del glicano puede encontrarse fucosilada o no fucosilada en cualquiera de los N-glicanos anteriormente indicados i) a viii). Una Man en un punto de ramificación se encuentra xilosilada o no xilosilada en cualquiera de los N-glicanos anteriormente indicados i) a viii).

En una forma de realización particularmente preferida, todos los N-glicanos indicados en la lista anterior, i) a viii), se encuentran en la cantidad preferida según se proporciona en el párrafo anterior.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprende el N-glicano i), $\text{-GlcNAc}_2\text{-(Man}_2\text{metil-Hex)}$, en una cantidad de por lo menos 0.5%, por lo menos 1%, por lo menos 2% o por lo menos 3%. Especialmente preferentemente se encuentra en una cantidad de como máximo 30%, como máximo 25%, como máximo 20% o como máximo 15%. La cantidad del mismo se encuentra comprendida en el intervalo de 0.5% a 30%, de 1% a 25% o de 2% a 20%.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprende el N-glicano ii), $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_3$, en una cantidad de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 45% o de por lo menos 50%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 80%, como máximo 75%, como máximo 70% o como máximo 65%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 30% a 80%, 40% a 70% o 45% a 60%. Éste es el N-glicano más importante según la invención y puede encontrarse presente en dichas cantidades en cualquier forma de realización de la invención.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprenda el N-glicano iii), -GlcNAc₂-Man₃-GlcNAc, en una cantidad de por lo menos 0.5%, por lo menos 2%, por lo menos 4% o por lo menos 6%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 30%, como máximo 25%, como máximo 20% o como máximo 15%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0.5% a 30%, 1% a 25% o 2% a 20%.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprenda el N-glicano iv), -GlcNAc₂-Man₃-GlcNAc₂, en una cantidad de por lo menos 0.2%, por lo menos 0.5%, por lo menos 1% o por lo menos 2%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 20%, como máximo 15%, como máximo 12% o como máximo 10%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0.5% a 15%, 1% a 12.5% o 2% a 10%.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprenda el N-glicano v), -GlcNAc₂-Man₃-Hex₂, en una cantidad de por lo menos 0.01%, por lo menos 0.05%, por lo menos 0.1% o por lo menos 0.5%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3% o como máximo 2%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0.1% a 5%, 0.2% a 4% o 0.5% a 3%.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprenda el N-glicano vi), -GlcNAc₂-Man₃-Hex₃, en una cantidad de por lo menos 0.1%, por lo menos 0.2%, por lo menos 0.75% o por lo menos 1%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 11%, como máximo 10%, como máximo 8% o como máximo 6%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0.5% a 11%, 1% a 10% o 2% a 9%.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprenda el N-glicano vii), -GlcNAc₂-Man₃-Hex₄, en una cantidad de por lo menos 0.1%, por lo menos 0.2%, por lo menos 0.3% o por lo menos 0.4%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6.5% o como máximo 5%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0.1% a 10%, 0.2% a 8.5% o 0.3% a 7%.

Asimismo resulta preferido que el patrón de glucosilación comprenda el N-glicano viii), -GlcNAc₂-Man₃-Hex₅, en una cantidad de por lo menos 0.1%, por lo menos 0.2%, por lo menos 0.3% o por lo menos 0.4%. Especialmente preferentemente, se encuentra en una cantidad de como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6.5% o como máximo 5%. La cantidad del mismo puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0.1% a 10%, 0.2% a 8.5% o 0.3% a 7%.

Las proteínas lisosómicas inventivas pueden ser de cualquier origen, preferentemente de mamífero, especialmente humanas o de un animal no humano, tal como un roedor, un perro, gato, caballo, vaca, camello o cerdo.

Las glucoproteínas producidas por plantas, incluyendo las proteínas lisosómicas producidas por briófitos inventivas habitualmente no presentan manosas fosforiladas. Asimismo según la invención, los N-glicanos pueden presentar manosas no fosforiladas, especialmente no fosforiladas en absoluto. La fosforilación puede llevarse a cabo artificialmente mediante la introducción de un enzima fosforilante en la célula de expresión o mediante fosforilación después del aislamiento de la proteína a partir de las células. De esta manera, la composición de proteína lisosómica según la invención comprende proteínas lisosómicas no fosforiladas o fosforiladas. Preferentemente, la cantidad de N-glicanos fosforilados de las proteínas lisosómicas de la composición es inferior a 20%, especialmente preferentemente inferior a 15%, inferior a 10%, inferior a 5%, inferior a 2%, inferior a 1% o incluso inferior a 0.5%, por ejemplo, de 0% (% molar).

Las proteínas lisosómicas inventivas pueden encontrarse PEGiladas o no PEGiladas. La PEGilación puede modificar la solubilidad, la biodisponibilidad y la semivida *in vivo* al administrarlas en un paciente. Dado que la semivida de las proteínas lisosómicas glucosiladas paucimanosídicamente de la invención se encuentra reducida debido a la estructura de N-glicano más pequeña en comparación con las proteínas lisosómicas producidas en mamíferos, la PEGilación resulta especialmente preferida para compensar esta desventaja. Resulta especialmente preferida una PEGilación reversible, que conduzca a una pérdida por lo menos parcial de la PEGilación *in vivo*, por ejemplo, mediante la introducción de un enlace hidrolizable, tal como una base de Schiff, de manera que no interfiera con la incorporación celular. Además, como medida para reducir la interferencia en la incorporación celular, la PEGilación puede ser de las cadenas de PEG cortas, tales como PEG con 4 a 1000, preferentemente 8 a 100 o 10 a 50 subunidades. En lugar de PEG, puede utilizarse cualquier polímero hidrofílico corto para incrementar la semivida, preferentemente con un peso molecular inferior a 100 kDa, inferior a 10 kDa o inferior a 1 kDa. El PEG preferentemente presenta 2 a 200, preferentemente 3 a 100 o 4 a 50 subunidades de glicol. La proteína lisosómica puede PEGilarse mediante una fracción de enlace como medio para la unión indirecta de la molécula de PEG. Alternativamente, asimismo resulta posible la unión directa.

Preferentemente, las proteínas lisosómicas inventivas no se encuentran entrecruzadas. El entrecruzamiento puede interferir con la incorporación y estabilidad celulares y resulta menos preferente. Preferentemente, el

entrecruzamiento se combina con la PEGilación. Por ejemplo, puede utilizarse PEG como agente entrecruzante, especialmente en el caso de PEG bifuncional o multifuncional que presenta por lo menos dos grupos funcionales para la unión a una proteína, tal como bis-COOH-PEG o bis-NHS-PEG. La PEGilación puede enmascarar los aspectos negativos del entrecruzamiento que causan interferencia con la incorporación y estabilidad celulares.

El entrecruzamiento puede conducir a la formación de proteínas lisosómicas multiméricas, especialmente proteínas lisosómicas dimericas preferidas, tales como, por ejemplo, las indicadas para la alfa-galactosidasa en el documento WO 2011/107990. En las proteínas entrecruzadas, por lo menos dos proteínas lisosómicas están conectadas directa o indirectamente mediante una fracción de enlace.

El entrecruzamiento y/o PEGilación puede realizarse mediante una fracción de enlace. Por ejemplo, la fracción de enlace es opcionalmente una fracción que se une covalentemente a una cadena lateral, un extremo N-terminal o C-terminal, o una fracción relacionada con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, una fracción sacárida) de un monómero de proteína lisosómica, así como a una cadena lateral, un extremo N o un extremo C, o una fracción relacionada con las modificaciones postraduccionales (por ejemplo, una fracción sacárida) de otro monómero de proteína lisosómica. Se describen en detalle posteriormente en la presente memoria fracciones de enlace ejemplificativas similares.

Alternativamente, la fracción de enlace forma una parte de los monómeros de proteína lisosómica que se unen (por ejemplo, una parte de una cadena lateral, extremo N-terminal o C-terminal, o una fracción relacionada con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, una fracción sacárida) de un monómero de proteína lisosómica, así como una fracción relacionada con modificaciones postraduccionales (por ejemplo, una fracción sacárida) de otro monómero de proteína lisosómica. De esta manera, por ejemplo, la fracción de enlace puede ser un enlace covalente (por ejemplo, un enlace amida) entre un grupo funcional de una cadena lateral, extremo N, extremo C o fracción relacionada con modificaciones postraduccionales de un monómero (por ejemplo, una amina) y un grupo funcional complementario de una cadena lateral, extremo N, extremo C o fracción relacionada con modificaciones postraduccionales de otro monómero (por ejemplo, carboxilo), en el que dicho enlace covalente se encuentra ausente de la forma nativa de la α -galactosidasa. Asimismo se encuentran contemplados otros enlaces covalentes, tales como, por ejemplo, un enlace éster (entre un grupo hidroxilo y un carboxilo), un enlace tioéster, un enlace éter (entre dos grupos hidroxilo), un enlace tioéter, un enlace anhídrido (entre dos carboxilos), un enlace tioamida, un enlace carbamato o tiocarbamato. Opcionalmente, la fracción de enlace se encuentra libre de un enlace disulfuro. Sin embargo, una fracción de enlace que incluye un enlace disulfuro en una posición que no forma un enlace entre monómeros (por ejemplo, el corte del enlace disulfuro no corta el enlace entre los monómeros) se encuentra comprendida en el alcance de la presente forma de realización de la invención. Una ventaja potencial de la fracción de enlace que no presenta un enlace disulfuro es que no es susceptible de corte bajo condiciones suavemente reductoras, como sí ocurre con los enlaces disulfuro. Opcionalmente, la fracción de enlace es una fracción no peptídica (por ejemplo, la fracción de enlace no consiste en un enlace amida, un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un oligopéptido o un polipéptido). Alternativamente, la fracción de enlace puede ser, o puede comprender, una fracción peptídica (por ejemplo, un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un oligopéptido o un polipéptido). Opcionalmente, la fracción de enlace no es meramente una extensión lineal de cualquiera de los monómeros de proteína lisosómica unidos al mismo (es decir, el extremo N y el extremo C de la fracción peptídica no se encuentra unido directamente al extremo C o N de cualquiera de los monómeros de proteína lisosómica). Alternativamente, la fracción de enlace está formada por la unión covalente directa de un extremo N de un monómero de proteína lisosómica a un extremo C de otro monómero de proteína lisosómica, de manera que se produce un polipéptido fusionado. Dicho polipéptido no será una forma nativa de α -galactosidasa, aunque puede comprender dos monómeros de proteína lisosómica esencialmente en su forma nativa. Sin embargo, la unión covalente de monómeros de α -galactosidasa indicada en la presente memoria preferentemente es en una forma diferente del enlace directo de un extremo N a un extremo C. La fracción de enlace es preferentemente una fracción pequeña, de 10 a 1000 Da, preferentemente de 20 a 500 Da.

En el entrecruzamiento y/o la PEGilación, la fracción de enlace puede comprender uno o más grupos reactivos para la unión a la proteína lisosómica. Dichos grupos reactivos pueden reaccionar, por ejemplo, con un grupo tiol o reaccionar con un grupo amina para formar un enlace amida. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "grupo reactivo" describe un grupo químico que es capaz de experimentar una reacción química que típicamente conduce a la formación de un enlace. El enlace, según las presentes formas de realización, es preferentemente un enlace covalente (por ejemplo, para cada uno de los grupos reactivos). Entre las reacciones químicas que conducen a la formación de un enlace se incluyen, por ejemplo, sustituciones nucleofílicas y electrofílicas, reacciones de adición nucleofílicas y electrofílicas, alquilaciones, reacciones de adición-eliminación, reacciones de cicloadición, reacciones de reorganización y cualesquiera otras reacciones orgánicas conocidas que implican un grupo funcional, así como combinaciones de los mismos. El grupo reactivo puede comprender opcionalmente una parte no reactiva (por ejemplo, un alquilo) que puede servir, por ejemplo, para unir una parte reactiva del grupo reactivo a una fracción de enlace (por ejemplo, poli(alquilenglicol) o análogo del mismo) indicada en la presente memoria. El grupo reactivo preferentemente se selecciona de manera que permita su conjugación a la proteína lisosómica. Entre los grupos reactivos ejemplificativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carboxilato (por ejemplo, $-\text{CO}_2\text{H}$), tiol ($-\text{SH}$), amina ($-\text{NH}_2$), halo, azida ($-\text{N}_3$), isocianato ($-\text{NCO}$), isotiocianato ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), carbonilo (por ejemplo, aldehído), maleimida, sulfato, fosfato, sulfonilo (por ejemplo,

mesilo o tosilo), etc., así como grupos activados, tales como N-hidroxisuccinimida (NHS) (por ejemplo, ésteres de NHS), sulfo-N-hidroxisuccinimida, anhídrido, haluro de acilo ($-C(=O)-$ halógeno), etc. En algunas formas de realización, el grupo reactivo comprende un grupo saliente, tal como un grupo saliente susceptible de sustitución nucleófila (por ejemplo, halo, sulfato, fosfato, carboxilato o N-hidroxisuccinimida).

La invención proporciona, además, la proteína lisosómica o composición inventiva a modo de un medicamento. Se proporciona, además, una composición de proteína lisosómica según la invención para la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómica, que comprende la administración de una composición de proteína lisosómica en un paciente, por ejemplo, un mamífero. Con relación a lo anterior, la invención proporciona la proteína lisosómica inventiva para la utilización en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómica. El paciente puede ser un mamífero, especialmente un ser humano o un animal no humano, tal como un roedor, un perro, gato, caballo, vaca, camello o cerdo. Preferentemente, la proteína lisosómica es de la misma especie que el paciente, a fin de evitar reacciones inmunitarias contra la cadena de aminoácidos de la proteína.

Preferentemente, la enfermedad y proteína lisosómica se seleccionan de la tabla a continuación:

Enfermedad	Proteína lisosómica
Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A (GLA)
Enfermedad de Gaucher	β -Glucocereamidasa, β -glucosidasa (glucocerebrosidasa)
Alfa-manosidosis	α -Manosidasa
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Beta-manosidosis	β -Manosidasa
Enfermedad de Farber	Ceremidasa ácida
Fucosidosis	α -Fucosidasa
Gangliosidosis GM1	β -Galactosidasa, proteína activadora de β -hexosaminidasa
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa, galactoceramidasa
Deficiencia de lipasa ácida lisosómica (LAL)	Lipasa ácida lisosómica (LAL)
Mucopolisacaridosis (MPS, tipo I-IX)	
MPS I	α -Iduronidasa
MPS II	Iduronato-2-sulfatasa
MPS IIIA	Glucosamina-N-sulfatasa; Heparán-sulfatosulfamidasa (SGSH)
	α -N-Acetil-glucosaminidasa (NAGLU)
MPS IIIB	α -Glucosaminidasa-N-acetiltransferasa
MPS IIIC	N-Acetilgalactosamina-6-sulfatasa
	Galactosa-6-sulfato sulfatasa
MPS IIID	β -Galactosidasa
MPS IVA	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatasa
MPS IVB	β -Glucuronidasa
MPS VI	
MPS VII	
MPS IX	Hialuronidasa
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa
Enfermedad de Pompe	Alfa-1,4-glucosidasa (ácida)
Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa, o su subunidad α
Enfermedad de Schindler	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa (NAGA); α -galactosaminidasa
Síndrome de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A
Sialidosis	Neuraminidasa

La dosis para la administración es preferentemente una dosis de 0.05 a 100 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0.1 a 50 mg/kg de peso corporal, especialmente preferentemente de 0.3 a 10 mg/kg de peso corporal, tal como de 0.3, 1 o 3 mg/kg de peso corporal.

Debido a que no existe cura para las enfermedades de almacenamiento lisosómica, se requiere un tratamiento crónico con administraciones repetidas de sustitución enzimática a intervalos regulares. Preferentemente, la proteína lisosómica inventiva se administra en un intervalo de 1 a 30 días, preferentemente de 2 a 25 días, más preferentemente de 3 a 23, o incluso de 4 a 22 días, de 5 a 21 días, de 6 a 20 días, de 7 a 19 días, de 8 a 18 días, de 9 a 17 días, de 10 a 16 días o de 11 a 15 días. Resultan especialmente preferidos los intervalos de 14 días. La administración en dichos intervalos permite una actividad enzimática constante en los lisosomas de las células, contrarrestando la eliminación de la proteína.

Las proteínas lisosómicas pueden administrarse por cualquier vía que conduce a que un enzima funcional alcance el sistema vascular, especialmente el torrente sanguíneo. Resulta preferida la infusión intravenosa (i.v.). Entre las vías adicionales de administración se incluyen la administración intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) y subcutánea (s.c.). Las vías de administración i.p., i.m. y s.c. pueden conducir a una distribución reducida de la

proteína lisosómica en el tejido diana (tal como corazón, riñón, hígado y bazo), todavía pueden administrarse cantidades suficientes en dichos tejidos por dichas vías. Estas vías no i.v., en particular i.p., i.m. y s.c., se benefician de una mejor aceptación por el paciente y habitualmente el beneficio supera la distribución reducida en los tejidos diana. Además, los perfiles farmacocinéticos de las administraciones no i.v. resultan beneficiosos, ya que el enzima terapéutico se encuentra disponible en el plasma de los pacientes durante un periodo de tiempo prolongado.

En formas de realización preferidas, el tratamiento médico inventivo con una proteína lisosómica de la invención (producida en un briófito) es en combinación con una proteína lisosómica del mismo tipo y actividad enzimática cualitativa, aunque producido en una especie no vegetal, especialmente células de mamífero o fúngicas. La proteína lisosómica producida en una especie no vegetal puede presentar una manosa fosforilada para el reconocimiento del receptor de manosa-6-fosfato (M6PR) y la incorporación celular. Además, puede utilizarse una proteína lisosómica con manosa (artificialmente) fosforilada de cualquier origen en combinación con la proteína lisosómica inventiva. Dichas proteínas lisosómicas fosforiladas o de especie no briófito ya se están utilizando, tal como Agalsidasa alfa (Replagal®) y Agalsidasa beta (Fabrazyme®) en el caso de la alfa-galactosidasa adecuada para el tratamiento de la enfermedad de Fabry; Alglucerasa (Ceredase®), Imiglucerasa, Velaglucerasa alfa (VPRIV), como β -glucocerebrosidasas, adecuadas para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher; A1-glucosidasa alfa (Myozyme®) adecuada para el tratamiento de la enfermedad de Pompe; Idursulfasa (Elaprase®), el enzima lisosómico iduronato-2-sulfatasa adecuado para el tratamiento del síndrome de Hunter (MPS-II). Asimismo resultan posibles otras proteínas lisosómicas producidas en plantas para la utilización en combinación, tal como Taliglucerasa alfa (Elelyso®), una glucocerebrosidasa. La proteína lisosómica fosforilada y/o no de briófito puede entrecruzarse con la proteína lisosómica paucimanosídica. El dímero o multímero entrecruzado preferentemente se encuentra adicionalmente PEGilado. Lo anterior mejora la estabilidad, semivida e incorporación.

La proteína lisosómica inventiva con glucosilación paucimanosídica asimismo puede combinarse con un chaperón, en particular un chaperón específico o no específico de la proteína lisosómica del mismo tipo y actividad enzimática cualitativa. Un chaperón farmacológico de proteínas lisosómicas es, por ejemplo, 1-desoxigalactonojirimicina (Migalastat). El chaperón es capaz de modificar, reestableciendo alguna actividad de una proteína lisosómica endógena disfuncional en una enfermedad de almacenamiento lisosómico. La proteína lisosómica endógena puede, y habitualmente es, una proteína lisosómica fosforilada y puede complementar la interacción de receptores de la proteína lisosómica paucimanosídica inventiva (tal como se ha indicado anteriormente para las terapias de combinación para administraciones de la proteína fosforilada o de no briófito. Sin limitación a una terapia específica, aparentemente el chaperón puede restaurar o incrementar la actividad enzimática de la proteína lisosómica, que presenta una actividad alterada debido a una mutación que causa la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Resulta especialmente preferido, se utiliza Migalastat en combinación con una alfa-galactosidasa paucimanosídica o producida en un briófito inventiva y/o se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

La combinación con enzimas lisosómicos fosforilados o no de briófito, especialmente aquellos con reconocimiento de M6PR debido a la fosforilación, complementa la actividad de incorporación de los enzimas inventivos, permitiendo que alcance todas las células terapéuticamente relevantes con una eficiencia incrementada y un alcance terapéutico más amplio de aplicación.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes, sin limitarse a dichas formas de realización de la presente invención. Cualquier elemento de los ejemplos puede combinarse con los conceptos inventivos tal como se ha indicado anteriormente.

Figuras:

Figura 1: casete de expresión linealizado para la expresión de proteína lisosómica (secuencia de proteína: GLA).

Figura 2: resultados intermedios y finales de una purificación típica de α -gal A (SDS-PAGE con tinción de plata).

Figura 3: purificación de glucocerebrosidasa a partir de sobrenadante de cultivo (SDS-PAGE con tinción de Coomassie).

Figura 4: purificación de alfa-glucosidasa a partir de sobrenadante de cultivo. SDS-PAGE con tinción de Coomassie de eluido concentrado de cromatografía-ConA. A) Eluido de GAA de musgo frente a alglucosidasa alfa (Myozyme). B) Eluido de GAA de musgo frente a Estándar de peso molecular.

Figura 5: caracterización *in vitro* de los enzimas. (a) Preparaciones enzimáticas separadas en SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Los carriles 1 y 2 son aGal de musgo y agalsidasa alfa, respectivamente. Los carriles 3 y 4 son aGal de musgo y agalsidasa alfa digerido con PNGasa F. Flecha, enzimas α -gal A después de la digestión; cabeza de flecha, PGNasa F (36 kDa). El estándar de proteína y los pesos moleculares se muestran a la izquierda. (b) aGal de musgo y agalsidasa alfa (1 ng cada uno) detectados mediante transferencia western mediante la utilización de un anticuerpo policlonal específico de α -gal A humano. Se muestran datos

representativos de 3 experimentos independientes. (c) Actividades de α -gal A específicas de preparaciones enzimáticas determinadas mediante la utilización de sustrato 4-MU- α -D-galactopiranosido artificial. Se midieron las concentraciones de proteína mediante ensayo de BCA. (d) Estabilidad de los enzimas diluidos en plasma humano tamponado y calentado a 37°C (los datos son medias de muestras por triplicado). Rico en man: aGal rico en manosa; aGal de musgo: α -galactosidasa de musgo; Agal-alfa: agalsidasa alfa; Agal-beta: agalsidasa beta.

Figura 6: estudio de incorporación *in vitro*. (a) Actividades de α -gal A intracelular de fibroblastos de pacientes de enfermedad de Fabry (DMN96.125) después de la incubación durante la noche con diferentes enzimas en presencia o en ausencia de M6P 5 mM o 2 mg/ml de manano de levadura. (b) La tinción de inmunofluorescencia de Gb₃ mostró una acumulación lisosómica masiva de Gb₃ en fibroblastos de pacientes de enfermedad de Fabry no tratados (arriba) y una reducción significativa de Gb₃ en células que habían sido tratadas con aGal de musgo (abajo). (c y d) Expresión del RM en fibroblastos de pacientes de enfermedad de Fabry y en células endoteliales microvasculares IMFE1. Las células IMFE1 eran positivas para RM, según determinación mediante transferencia Western (c) y tinción de inmunofluorescencia (d), mientras que los fibroblastos eran negativos para RM. (e) Actividades de α -gal A intracelulares de células IMFE1 después de la incubación durante la noche con diferentes enzimas en presencia o en ausencia de M6P 5 mM o 2 mg/ml de manano de levadura. (f) Tasas de incorporación de diferentes enzimas en células IMFE1. Las células se recolectaron en los puntos temporales indicados y se midieron las actividades intracelulares. ***P<0.001, aGal de musgo vs. aGal rico en man o agalsidasa alfa. (g) Análisis de transferencia Western de α -gal A internalizado en células IMFE1 tras 3 horas de incubación con diferentes preparaciones enzimáticas. (h) Unión de diferentes enzimas a células IMFE1. Tras 3 horas de incubación a 4°C, se determinaron los enzimas unidos a superficie celular mediante ensayo enzimático. La línea de puntos indica el nivel de actividad de células IMFE1 tratadas simuladamente en dicho ensayo (es decir, el nivel de fondo). *P<0.05, ***P<0.001. Todos los datos en los gráficos se presentan como medias $\pm$ SEM (n=3-4).

Figura 7: farmacocinética plasmática. (a) Eliminación plasmática de aGal de musgo infundida y agalsidasa alfa analizada por actividades enzimáticas. (b) Transferencia western de α -gal A en plasma 10 min después de la infusión. (c) Cantidades de proteína α -gal A en plasma 5 y 10 min después de la infusión; se analizaron las intensidades de las bandas de transferencia western mediante densitometría. (d) Correlación entre las cantidades de proteína α -gal A y las actividades enzimáticas en plasma 10 min después de la inyección. Los datos en (a) y (c) se presentan como medias $\pm$ SEM (n=4-5). *P<0.05, **P<0.01.

Figura 8: distribución en tejidos de los enzimas infundidos. Las preparaciones de enzima se inyectaron en ratones Fabry y se midieron las actividades de α -gal A en riñón, corazón, bazo e hígado 2 horas después de la inyección. (a) Actividades específicas en órganos. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM (n=5). *P<0.05, **P<0.01. (b) Se calcularon las actividades en órganos completos y se presentan los datos en % de actividad total recuperada de 4 órganos. (c) Proteína α -gal A en homogeneizados de riñón detectados mediante transferencia Western. Flecha, banda específica de α -gal A en ratones inyectados con aGal de musgo. No se observó ninguna banda específica detectable en ratones inyectados con agalsidasa alfa. Cabeza de flecha, posición aproximada a la que puede migrar la banda de agalsidasa alfa (basándose en los resultados mostrados en las figuras 2b, 4b).

Figura 9: localización celular de aGal de musgo y agalsidasa alfa infundidas. La distribución celular de enzimas infundidos en el corazón y riñón se determinó mediante inmunohistoquímica (n=2). Se muestran fotografías representativas. (a) Corazón. Los asteriscos indican los vasos sanguíneos con células positivas para inmunotinción (muy probablemente, células endoteliales) y las flechas indican las células perivasculares positivas (presumiblemente macrófagos). (b) Riñón. Las flechas indican las células epiteliales tubulares de inmunotinción positiva. Barra de escala: 25 μ m. Ampliación original: 400x.

Figura 10: cinética en los tejidos de los enzimas infundidos. Las preparaciones enzimáticas se inyectaron en ratones Fabry y se midieron las actividades de α -gal A en riñón (A), corazón (b), bazo (c) e hígado (d) a las 2, 24, 48 y 96 horas de la inyección. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM (n=4-5). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figura 11: eficacia de aGal de musgo en la eliminación de Gb₃ acumulado en tejidos. El contenido de Gb₃ en riñón (a), corazón (b) e hígado (c) se analizó 7 días después de una única infusión de aGal de musgo o agalsidasa alfa a diversas dosis. Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM (n=4-5). *P<0.05, ***P<0.001. La significancia estadística mostrada sobre cada grupo inyectado con agalsidasa alfa indica la diferencia entre agalsidasa alfa y la misma dosis de aGal de musgo.

Figuras 12 a 14: actividades plasmática y tisular para la administración i.p. (figura 12), i.m. (figura 13) y s.c. (figura 14).

Ejemplos

Ejemplo 1: producción de alfa-galactosidasa humana en musgo.

5 Ejemplo 1.1: construcción de cepa de expresión

La secuencia de ADN del gen GLA humano (secuencia de referencia de NCBI: NM_000169.2) codificante de la alfa-galactosidasa A (α -gal A) sin la secuencia de señal nativa (SEC ID nº 3) se sintetizó en forma de una versión de codones optimizados (SEC ID nº 4) y se subclonó en un vector de expresión musgo en GeneArt / Thermo Fisher Scientific (GENEART AG, Regensburg, Alemania). Las secuencias que alojaban el constructo de expresión de α -gal A y un constructo génico que proporciona resistencia a la neomicina (npt II) se extrajeron en forma de casetes de expresión lineal (figura 1) de los plásmidos mediante la utilización de enzimas de restricción.

Con el fin de generar líneas celulares de musgo productoras de α -gal A estables, se transformaron protoplastos de una línea de musgo de doble inactivación sin residuos de α -1,3-fucosa y β -1,2-xilosa específicamente vegetales en sus N-glicanos (Koprivova *et al.*, Plant Biotechnol. J. 2:517-523, 2004; Weise *et al.*, Plant Biotechnol. J. 5(3):389-401, 2007; documento WO 2004/057002) con los casetes de expresión purificados en un procedimiento de transformación basado en PEG (Strepp *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:4368, 1998). Las células de musgo transformadas se regeneraron y se seleccionaron para la resistencia al antibiótico G418. Se cribaron 2000 plántulas de musgo resistentes en dos rondas consecutivas para la acumulación de α -gal A total por biomasa, en donde la mejor cepa se convirtió en la cepa de producción estándar.

El casete de expresión linealizado comprende los elementos genéticos siguientes: promotor actina de *Physcomitrella* (actina P) y 5' UTR, péptido de señal vegetal (PS), secuencia de ADNc de α -gal humana sin secuencia de señal nativa (GLA), 3' UTR de tubulina de *Physcomitrella*, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (P 35S), gen de neomicina fosfotransferasa (nptII) y terminador 35S de virus del mosaico de la coliflor (T 35S) (figura 1). El péptido de señal vegetal contenía la secuencia MAFYKISSVFFIFCFFLIAPFHSA (SEC ID nº 5).

La cepa de expresión es una planta de musgo totalmente regenerada que presenta el transgén aGal establemente integrado en su genoma bajo el control genético de los elementos reguladores derivados del musgo.

Ejemplo 1.2: producción de enzima

La cepa de producción de α -Gal A se cultivó durante 4 semanas (27 d) en una bolsa desechable de 20 l (Cellbag 20, GE Healthcare, Alemania) en un agitador de balanceo Rocker Wave™ (BioWave 20 SPS, Wave Biotech AG, Suiza). Los parámetros de cultivo eran: tasa de balanceo de 25 a 30 rpm, ángulo de 8°, medio SM07 (NaCl 100 mM, KCl 6.6 mM, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 20.4 mM, FeNa-EDTA 0.05 mM, MES 4.9 mM, PEG4000 al 0.1% (p/v), H_3BO_3 100.26 μM , $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.11 μM , $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 μM , KI 5 μM , $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 85.39 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1.03 μM , $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04 μM , acetato de Zn $\times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.039 μM), 25°C, 0.3 l $\times \text{min}^{-1}$ de aire presurizado complementado con 2% a 4% de CO_2 e iluminación a 130 a 310 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 24 h de luz al día, administrados por paneles de luz dotados de Osram FQ 24W 840 HO, Lumilux Cool White. El medio se complementó adicionalmente con 1000x mezcla de vitaminas Nitsch (mezcla de vitaminas Nitsch, Duchefa, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El pH de la fermentación se controló automáticamente a pH 5-6 mediante titulación con H_2SO_4 0.5 M y NaOH 0.5 M con ayuda de WAVEPOD I (GE Healthcare) en combinación con Pump20 (GE Healthcare).

Después del final del cultivo, el caldo de cultivo se sometió a la cascada de filtración en tres etapas siguientes para proporcionar un filtrado estéril clarificado libre de musgo: 1) recolección de musgo mediante filtración de torta en carcasa de filtración de PP personalizada (Grosse *et al.*, documento WO 2014/013045 A1, 2014) dotada de Zetaplus (01SP B3002, 3M, Alemania), 2) filtración de lecho profundo por una cápsula Scale-Up de doble capa (E0340FSA60SP03A, 3M, Alemania) y 3) una etapa de filtración estéril final (Millipore Express™ Plus, 0,22 μm , Millipore, Alemania).

Posteriormente, el filtrado estéril se concentró y se intercambió el tampón mediante la utilización de filtración de flujo tangencial (TFF) (Pall Centramate 500S, membrana de celulosa de 30 kDa de corte). Después de una serie de tres etapas cromatográficas (Butyl-650M, DEAE, S), α -gal A y α -gal A rico en man aislados, respectivamente, se concentraron a aprox. 0,5 mg/ml transferidos al tampón de formulación y se caracterizaron. El enzima se almacenó a $\leq -65^\circ\text{C}$ hasta la utilización posterior. Los resultados de un procedimiento típico de purificación se ilustran en la figura 2.

Mediciones de la actividad enzimática:

Se midió la actividad de α -gal A mediante un ensayo fluorimétrico mediante la utilización de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido 5 mM a pH 4,4 en presencia de N-acetilgalactosamina 0.1 M, un inhibidor específico de α -galactosidasa B. Se midió la concentración de la proteína mediante la utilización del kit de ensayo de proteína BCA

(Pierce) siguiendo las instrucciones del proveedor. La actividad se expresó en $\mu\text{moles/mg}$ de proteína/hora. Los resultados se resumen en la figura 5c.

SDS-PAGE con tinción de plata:

Las muestras se desnaturalizaron en tampón para muestras de SDS complementado con agente reductor (Invitrogen) a 95°C durante 5 min. Se utilizaron geles NuPAGE Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) para la separación de la proteína. Se llevó a cabo la tinción con plata mediante la utilización del kit de tinción SilverQuest™ (Invitrogen) siguiendo el manual del proveedor.

ELISA de proteína de célula huésped (HCP)

Con el fin de cuantificar los niveles de HCP remanente en la α -gal A purificada, se desarrolló un nuevo ELISA de HCP (Biogenes GmbH, Alemania). Brevemente, se llevó a cabo una fermentación simulada con el tipo salvaje respectivo, se recolectó el medio y se concentró. La solución de proteína concentrada se utilizó para la inmunización de conejos. Se utilizaron las IgG totales para generar un ELISA de tipo sándwich para la cuantificación de la HCP. Los resultados mostraron un agotamiento típico de las HCP durante todo el procedimiento de purificación en un factor de 10000.

Ejemplo 1.4: resumen de producción

La producción de aGal de musgo se llevó a cabo en un procedimiento de fermentación fotoautótrofica en una bolsa desechable de un solo uso de 10 l instalada en un agitador de balanceo Wave™. El musgo, cultivado en ausencia de ningún antibiótico, secretó aGal de musgo al medio de cultivo puramente mineral. La iluminación de las bolsas de cultivo era del exterior a un flujo fotónico medio de 200 $\mu\text{moles/m}^2\text{s}$. Tras alcanzar su densidad de cultivo final, se separó el musgo mediante filtración de torta respecto del medio y éste se clarificó mediante un sistema de filtro profundo de doble capa y filtración estéril final. El medio clarificado resultante se concentró y tamponó nuevamente mediante filtración de flujo tangencial.

A partir de dicha recolección concentrada, se purificó el enzima mediante un enfoque cromatográfico en tres etapas, utilizando consecutivamente una columna de interacción hidrófoba (CIH), una columna de intercambio aniónico (CIA) y una columna de intercambio catiónico (CIC). Finalmente, el eluido de la última columna se tamponó nuevamente y se concentró hasta 0.5 mg/ml.

El esquema de purificación proporcionó aGal de musgo puro (nivel de proteína de célula huésped (HCP) ~100 ppm, banda única de SDS-PAGE Coomassie, pureza de SE-HPLC: 99%) con un rendimiento típico de 30%.

Ejemplo 2: comparación de α -galactosidasa A

Ejemplo 2.1: producción de enzima y ensayo de actividad

Se obtuvo aGal de musgo paucimanosídica tal como se indica en el ejemplo 1. Esta cepa de producción se transformó adicionalmente con un constructo de inactivación con diana en el gen único de N-acetilglucosaminiltransferasa I (*GntI*) de *Physcomitrella patens* a fin de obtener cepas de producción de aGal rica en man. Con el fin de someter a ensayo el efecto del número incrementado de residuos manosilo terminales sobre la incorporación celular del enzima, asimismo se produjo α -gal A en una cepa de la que se había eliminado genéticamente su actividad de beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa (GNT-I). La modificación de inactivación resulta en una incapacidad del musgo de llevar a cabo ningún procesamiento de glicano de tipo complejo, ya que todas las últimas etapas enzimáticas carecen de su sustrato. Por lo tanto, el recorte mediado por alfa-manosidasa I en el cis-Golgi es la última etapa de procesamiento y, por lo tanto, todos los N-glicanos de dicha cepa son del tipo rico en manosa. La alfa-galactosidasa humana producida en dicha cepa se denomina aGal rica en man. La producción y purificación siguió el mismo esquema que en el ejemplo 1.

Se obtuvieron agalsidasa alfa (Shire, Replagal®) y agalsidasa beta (Genzyme, Fabrazyme®) de células de mamífero para los ensayos comparativos.

Los sedimentos celulares o tejidos de ratón se lisaron en Triton X-100 al 0.2% helado en solución salina. Los lisados se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C, y los sobrenadantes se utilizaron para el ensayo enzimático. Se midió la actividad de α -gal A mediante el ensayo fluorimétrico mediante la utilización de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido 5 mM a pH 4.5 en presencia de N-acetilgalactosamina 0.1 M, un inhibidor específico de la α -galactosidasa B. Se midió la concentración de proteína mediante la utilización del kit de ensayo de proteína BCA (Pierce). La actividad se expresó en nmoles/mg de proteína/hora.

Ejemplo 2.2: análisis de glicanos

El análisis de glicanos de aGal de musgo y agalsidasa alfa fue llevado a cabo por Protagen Protein Services (Dortmund, Alemania) mediante la utilización de HILIC-UPLC-MS. Brevemente, los N-glicanos se liberaron de la proteína enzimáticamente utilizando PNGasa F. Tras el lavado y desalado, los glicanos aislados se marcaron con 2-aminobenzamida (2-AB). Los glicanos marcados se separaron en una columna ACQUITY UPLC BEH Glycan (2.1x100 mm) mediante la utilización de un gradiente lineal de 78% a 55.9% de B (tampón A: formato amónico 100 mM, pH 4.5; tampón B: acetonitrilo) en 38.5 min a 60°C con un caudal de 0.5 ml/min. Las señales de glicanos eluyentes se registraron mediante un detector de fluorescencia (excitación a 330 nm, emisión a 420 nm). La asignación de los picos de fluorescencia a los glicanos respectivos se llevó a cabo mediante la utilización de los valores de m/z registrados (Xevo-QTOF MS, Waters) y software MasLynx (versión 4.1, Waters).

El análisis de glicanos de aGal rico en man se llevó a cabo de la manera siguiente. Se redujeron aproximadamente 25 µg de a-Gal (DTT 15 mM), se carbamidometilaron (yodoacetamida 55 mM) y se precipitaron con acetona (acetona:fase acuosa, 4:1). El sedimento se redisolvió en tampón de bicarbonato amónico 0.1 M y se digirió durante 12 h con tripsina a 37°C o quimiotripsina (ambas proteasas de grado de secuenciación, Roche, Mannheim).

Se cargaron aproximadamente 3 µg de cada digerido en una columna BioBasic C18 (BioBasic-18, 150 x 0.32 mm, 5 µm, Thermo Scientific) mediante la utilización de tampón de formato amónico 60 mM como el solvente acuoso. Se desarrolló un gradiente de 3% a 75% de acetonitrilo durante 25 min a un caudal de 6 µl/min. La detección se llevó a cabo con un espectrómetro de masas Waters Q-TOF Ultima dotado de la fuente ESI estándar en el modo de iones positivos. El análisis de los datos se llevó a cabo manualmente con MassLynx4.0.

Tabla 1: resultados del análisis de N-glicanos de aGal de musgo y enzimas comparativos.

Enzimas	Fórmula	Nombre	Manosas terminales	% relativo o abundancia
aGal de musgo	HexNAc2 Hex2 metil-Hex	Man3 + Metilo	2	24%
	HexNAc2 Hex3	Man3	2	57%
	(HexNAc2 Hex3) + HexNAc1	Man3 + 1x NAc	1	10%
	(HexNAc2 Hex3) + HexNAc2	Man3 + 2x NAc	0	4%
	(HexNAc2 Hex3) + (Hex) _n	Man5-Man8	3	4%
	No identificada			1%
Rico en man	(HexNAc2 Hex3) + Hex2	Man5	3	Dominante
	(HexNAc2 Hex3) + Hex1	Man4	2	Baja
	(HexNAc2 Hex3) + Hex3	Man6	3	Muy baja
	(HexNAc2 Hex3) + Hex4	Man7	3	Muy baja
Agalsidasa alfa (Replagal®)	(HexNAc2 Hex3) + Hex3		3	2%
	(HexNAc2 Hex3) + Hex2		2	4%
	(HexNAc2 Hex3) + HexNAc1 Hex2			
	(HexNAc2 Hex3 Fuc1) + HexNAc1		1	1%
	Glicanos fosforilados		0	24%
	28 estructuras complejas/híbridas diversas (cada una entre 0.1% y 7%)		Todas 0	63%
	No identificada			7%

A partir de la bioquímica de los glicanos, puede suponerse que HexNAc es N-acetilglucosamina y Hex es manosa. Las líneas 1 y 2 de aGal de musgo, Man₃ y Man₃+Metilo representan glucosilación paucimanosídica. Inesperadamente, dicha fracción rindió aproximadamente 80%. Rico en man y agalsidasa alfa representan productos comparativos.

En comparación con agalsidasa alfa, aGal de musgo presenta una composición de estructura muy homogénea, con elevada consistencia de los lotes. Una consistencia lote a lote elevada es una propiedad deseada para garantizar la reproducibilidad y expectativas de función.

Tabla 2: homogeneidad / estabilidad lote a lote de glicanos.

	Producto de células de mamífero (Replagal)	Producto de musgo (aGal de musgo)
Nº de lotes analizados	2	6
Nº de N-glicanos diferentes	38%	7
MAD media (desviación promedio de la media)*	48%	1.15%
* Media de todas las MAD en glicoformas individuales		

Ejemplo 2.3: termoestabilidad *in vitro*

Los enzimas se diluyeron en plasma obtenido de un individuo sano y se calentaron a 37°C durante los periodos de tiempo indicados. A fin de mantener un pH neutro, se añadió HEPES al plasma a una concentración final de 20mM. Tras el calentamiento, se midieron las actividades de α -gal A.

Ejemplo 2.4: caracterización *in vitro*

La aGal de musgo presentaba N-glicanos muy uniformes con $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ de tipo nuclear como estructura dominante (figura 5). Las cadenas de carbohidrato de aGal de musgo estaban constituidas prácticamente de modo exclusivo por manosa y GlcNAc, de los que ~85% terminaba en manosa, ~10% presentaba residuos terminales tanto de manosa como de GlcNAc y ~4% terminaba en GlcNAc (tabla 1). En comparación, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ era la estructura de glicano más abundante en aGal rico en man (tabla 1) con una pequeña cantidad de Man_4 , Man_6 y Man_7 . Tal como se esperaba, no había glicanos fosforilados tanto en aGal de musgo como en aGal rico en man. La agalsidasa alfa mostraba estructuras de glicano altamente heterogéneas, de las que ~24% eran glicanos fosforilados, ~7% eran glicanos terminados en manosa y 63% eran estructuras diversas (tabla 1).

En la SDS-PAGE, se detectó aGal de musgo como una sola banda principal con una movilidad mayor que la agalsidasa alfa (figura 5a), lo que refleja el menor contenido de carbohidratos de aGal de musgo. Tras la eliminación de los N-glicanos por PNGasa F, tanto aGal de musgo como agalsidasa alfa migraron a la misma posición (figura 5a). aGal rico en man presentaba una movilidad similar a la de aGal de musgo. En el análisis de transferencia western, tanto aGal de musgo como agalsidasa alfa fueron detectados por un anticuerpo policlonal de α -gal A humana (figura 5b). Con la misma cantidad de proteína cargada, la intensidad de la banda de aGal de musgo en la transferencia Western era 2.14 ± 0.58 veces ($n=3$) la de la agalsidasa alfa, probablemente debido a que las cadenas sacáridas más cortas en aGal de musgo podrían facilitar la accesibilidad del anticuerpo al epítipo o epítomos.

Las actividades específicas de aGal de musgo y aGal rico en man eran similares a las de la agalsidasa alfa y agalsidasa beta (figura 5c).

La aGal de musgo y la aGal de musgo rica en manosa presentaban prácticamente la misma estabilidad que la agalsidasa alfa y la agalsidasa beta una vez diluidas en plasma humano y calentadas a 37°C (figura 2d).

Ejemplo 3: producción de glucocerebrosidasa humana en musgo, adecuada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher**Ejemplo 3.1: construcción de cepa de expresión**

La secuencia de ADNc del gen GBA humano (identificador de Uniprot P04062- GLCM_HUMAN, secuencia de referencia de NCBI: NM_000157.3) fue sintetizada y subclonada en un vector de expresión de musgo por GeneArt™ (Thermo Fisher Scientific, GENEART AG, Regensburg, Alemania). La secuencia utilizada (SEC ID nº 7) era codificante de la GBA humana (SEC ID nº 6) sin el péptido de señal (PS) anotado nativo, que se había sustituido por un PS vegetal de 26 aa (se predice un corte preciso con una puntuación de 0.522 según la herramienta en internet SignalP4.1). La secuencia de GBA se modificó en una única base (posición de base 21 en SEC ID nº 7, AAA → AAG) utilizando un codón alternativo para el aminoácido lisina para facilitar la clonación (evitando un sitio de restricción HindIII). Las secuencias que incluían el constructo de expresión de GBA y un constructo génico que confería resistencia a la neomicina (nptII) se extrajeron en forma de casetes de expresión lineales a partir de los plásmidos mediante la utilización de enzimas de restricción.

Se utilizó una línea celular de musgo basada en una línea de doble inactivación que no presentaba residuos α -1,3-fucosa y β -1,2-xilosa específicamente vegetales en sus N-glicanos, tal como se indica en el ejemplo 1.1. Con el fin de generar líneas celulares de musgo productoras de glucocerebrosidasa estables, se transformaron protoplastos de dicha línea celular básica glucomanipulada con los casetes de expresión purificados (figura 1) en un procedimiento de transformación basado en PEG tal como se indica en el ejemplo 1.1. El casete de expresión linealizado comprendía los mismos elementos genéticos indicados en el ejemplo 1.1 y en la figura 1, con la excepción de la utilización de una secuencia de GBA humana en lugar de la secuencia de α -gal (GLA). Las células de musgo transformadas se regeneraron y se seleccionaron para resistencia al antibiótico G418. Se criaron aproximadamente 700 plántulas de musgo resistentes en dos rondas consecutivas para la acumulación de glucocerebrosidasa total por biomasa, en donde la mejor cepa se convirtió en la cepa de producción estándar. La glucocerebrosidasa humana producida en esta cepa se denominó GBA de musgo.

Ejemplo 3.2: producción y caracterización de enzimas

Para la producción se utilizaron las mismas condiciones y etapas que las indicadas para el ejemplo 1.2 y el ejemplo 2. La glucocerebrosidasa se purificó mediante filtración de flujo tangencial con un casete de celulosa de 10 kDa, cromatografía de intercambio catiónico (CaptoS) para la captura y filtración en gel (Sephadex) para el pulido. La glucoerebrosidasa purificada/enriquecida se analizó mediante transferencia Western, SDS-PAGE con tinción de Coomassie/plata y ensayo de actividad enzimática. El enzima purificado se almacenó a -20°C hasta la utilización posterior. Las etapas de purificación se muestran en la figura 3. Se obtuvieron glucosilaciones ricas en manosa similares. En una nueva tanda, se encontraron niveles más elevados de glicanos terminados en GlucNac de la forma MGn y GnGn. El tratamiento con beta-N-acetilglucosaminidasa restauró la distribución con una cantidad elevada de la forma de glicano paucimanosídica.

Ejemplo 3.3: ensayo de enzimas

La actividad de la glucocerebrosidasa purificada se evaluó mediante ensayo de actividad enzimática *in vitro*. Se incubó la glucocerebrosidasa en citrato de Na 60 mM, EDTA 1.3 mM, Triton-X100 al 0.15%, taurocolato sódico 0.125%, DTT 1 mM, 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 2 mM, pH 6 a 37°C. La reacción se detuvo con NaOH 1 M y se midió la formación de producto espectroscópicamente a 405 nm.

Ejemplo 4: producción de alfa-glucosidasa lisosómica humana en el musgo, adecuada para el tratamiento de la enfermedad de Pompe**Ejemplo 4.1: construcción de cepas de expresión**

La secuencia de ADNc del gen de GAA humano (identificador de Uniprot P10253 (LYAG_HUMAN), secuencia de referencia de NCBI: NM_000152.4), fue sintetizada y subclonada en un vector de expresión de musgo mediante GeneArt™ (Thermo Fisher Scientific, GENEART AG, Regensburg, Alemania). La secuencia utilizada (SEC ID nº 9) es codificante del precursor de GAA humano (SEC ID nº 8) sin el péptido de señal (PS) anotado nativo, que se sustituyó por un PS vegetal de 26 aa (se predice un corte preciso con una puntuación de 0.847 según la herramienta web SignalP4.1) y un propéptido truncado. La secuencia de GAA se modificó en una única base (posición de base 2484 en la SEC ID nº 9, ACG → ACA) mediante la utilización de un codón alternativo al aminoácido treonina para facilitar la clonación (evitando un sitio de restricción PvuI). Las secuencias que alojaban el constructo de expresión de GAA y un constructo génico que confiere resistencia a la neomicina (nptII) se extrajeron en forma de casetes de expresión lineales a partir de los plásmidos mediante la utilización de enzimas de restricción.

Se utilizó una línea celular de musgo basada en una línea con doble inactivación que no presenta residuos específicamente vegetales de α -1,3-fucosa y β -1,2-xilosa en sus N-glicanos tal como se indica en el ejemplo 1.1. Con el fin de generar líneas celulares productoras de alfa-glucosidasa estables, se transformaron protoplastos de dicha línea celular básica glucomanipulada con los casetes de expresión purificados (figura 1) en un procedimiento de transformación basado en PG tal como se indica en el ejemplo 1.1. El casete de expresión linealizado comprende los mismos elementos genéticos indicados en el ejemplo 1.1 y en la figura 1, con la excepción de la utilización de una secuencia de GAA humana (SEC ID nº 9) en lugar de la secuencia de α -gal (GLA) y un promotor de musgo diferente. Las células de musgo transformadas se regeneraron y se seleccionaron para resistencia frente al antibiótico G418. Se criaron aproximadamente 600 plántulas de musgo resistentes en dos rondas consecutivas para acumulación de precursor de alfa-glucosidasa total por biomasa, en donde la mejor cepa se convirtió en la cepa de producción estándar. La alfa-glucosidasa lisosómica humana producida en dicha cepa se denomina GAA de musgo.

Ejemplo 4.2: producción y caracterización de enzimas

Para la producción se utilizaron las mismas condiciones y etapas que las indicadas para el ejemplo 1.2 y el ejemplo 2. La alfa-glucosidasa se purificó mediante cromatografía de afinidad mediante la utilización de Con A sefarosa 4B. Se mezcló medio que contenía alfa-glucosidasa con el mismo volumen de acetato sódico 50 mM, NaCl 1 M, pH 5.2, para ajustar para las condiciones de unión apropiadas y se cargó en la columna de cromatografía. La elución se llevó a cabo mediante incrementado escalonado de la concentración de α -D-metilglucósido. La alfa-glucosidasa purificada/enriquecida se analizó mediante transferencia Western, SDS-PAGE con tinción de Coomassie/plata y ensayo de actividad enzimática. El enzima purificado se almacenó a 4°C o -20°C hasta la utilización posterior. El análisis de SDS-PAGE de GAA de musgo enriquecido se muestra en la figura 4. La identidad de la banda que contenía GAA de musgo se confirmó mediante análisis de EM.

La alfa-glucosidasa presenta 7 sitios de glucosilación, denominados G1 a G7. Las glucoformas de cada sitio se detectaron mediante EM/EM. El pico más intenso para la mayoría de sitios (excepto GS2 – GnM con 73%) se encontró que era la glucoforma GnGn. Por lo tanto, la preparación de enzima se trató con beta-N-acetilglucosaminidasa para cortar la GlcNAc terminal para convertir GnM y GnGn en glicanos paucimanosídicos.

Ejemplo 5: la administración mediada por receptor de manosa de α -galactosidasa A generada por musgo corrige eficientemente la deficiencia de enzima en la enfermedad de Fabry

Ejemplo 5.1: estudio de incorporación *in vitro*:

Se cultivaron fibroblastos cutáneos derivado de pacientes de enfermedad de Fabry (DMN96.125) y línea celular endotelial (IMFE1) en FBS al 10% en DMEM y EGM-2MV (Lonza), respectivamente. Ambas líneas celulares presentan actividades de α -gal A muy bajas y presentan una acumulación de Gb₃ lisosómica que es detectable mediante inmunotinción (Shen *et al.*, Mol. Genet. Metab. 95:163-168, 2008). Las células se incubaron con preparaciones de α -gal A (a una concentración final de 10 μ g/ml en presencia o en ausencia de M6P 5 mM o 2 mg/ml de manano de levadura mediante tratamiento con tripsina (tripsina al 0.25%/EDTA, 37°C) que asimismo elimina la α -gala A extracelular. Tras el lavado con PBS, los sedimentos celulares se lisaron para el ensayo enzimático o la transferencia Western.

Con el fin de someter a ensayo la capacidad de los enzimas de musgo en la degradación de Gb₃ acumulado, se incubaron las células DNN96.125 con preparaciones de α -gal A (10 μ g/ml) durante 4 días, sustituyendo el medio cada 1 a 2 días. Se utilizaron células falsamente tratadas a modo de controles sin tratamiento. Se detectó Gb₃ mediante inmunotinción tal como se indica posteriormente.

Se llevó a cabo el estudio de incorporación de enzima en fibroblastos derivados de pacientes de enfermedad de Fabry con enzimas exógenos a una concentración final de 10 μ g/ml. Tras 18 horas de incubación, los fibroblastos que se habían cargado con agalsidasa alfa o agalsidasa beta presentaban actividades de α -gal A intracelulares marcadamente incrementadas (116 y 134 veces la actividad de las células no tratadas, respectivamente) (figura 6^a). La incorporación de dichos enzimas resultó inhibida prácticamente por completo por M6P y resultó parcialmente inhibida por manano de levadura, confirmando que dicha incorporación era predominantemente a través de M6PR. Los fibroblastos se incubaron con aGal de musgo o aGal rica en man presentaban un incremento significativamente inferior de actividades de α -gal A intracelulares (6.4 y 4.8 veces las de células no tratadas, respectivamente) (figura 6a). La incorporación de tanto aGal de musgo como aGal rica en man no resultó inhibida por M6P o por manano. Lo anterior es consistente con la expresión reducida o nula de RM en dichas células (figura 6c, d). A pesar de la baja incorporación, la acumulación lisosómica de Gb₃ en fibroblastos de pacientes de enfermedad de Fabry se redujo significativamente después del tratamiento con aGal de musgo o aGal rico en man durante 4 días (figura 6b), sugiriendo que los enzimas α -gal A de musgo son capaces de degradar los sustratos acumulados en los lisosomas.

El enzima infundido por vía intravenosa en ERT es mejor incorporado por el endotelio vascular, que forma la primera barrera entre la sangre y el resto de los tejidos. Además, las células endoteliales son un tipo celular relevante para la enfermedad principal en algunas LSD, tales como la enfermedad de Fabry. Por lo tanto, los presentes inventores sometieron a ensayo la incorporación enzimática en células endoteliales microvasculares derivadas de pacientes de enfermedad de Fabry (IMFE1). Las células IMFE1 eran positivas para el RM según determinación mediante transferencia Western e inmunotinción (figura 6c, d). Tras la incubación durante un anoche, los enzimas α -gal A de musgo fueron eficientemente incorporados por las células IMFE1 (figura 6e). La incorporación de aGal de musgo o aGal rico en man por las células IMFE1 resultó bloqueada predominantemente por manano de levadura (inhibición ~60-80%) y resultó inhibida por M6P en un grado menor (~2-10%), sugiriendo que el RM contribuye principalmente a dicha incorporación. La incorporación de agalsidasa alfa o agalsidasa beta por las células IMFE1 resultó inhibida principalmente por M6P (~75-82%), aunque asimismo por manano.

La incorporación *in vitro* típicamente alcanza una etapa de meseta después de la incubación durante la noche. Con el fin de comparar las tasas de incorporación de diferentes preparaciones de α -gal A en una etapa adinámica, se incubaron células IMFE1 con los enzimas (10 μ g/ml) durante un tiempo más corto. La incorporación de aGal rica en man y agalsidasa alfa era aproximadamente lineal durante un máximo de 3 horas, con una tasa de incorporación significativamente más elevada de aGal rico en man que de agalsidasa alfa (figura 6f). La incorporación de aGal de musgo era notablemente más elevada que de aGal rico en man y agalsidasa alfa después de la incubación durante 1 hora y alcanzó una meseta en 1 a 3 horas (figura 6f). Se obtuvieron resultados similares en experimentos repetidos, incluyendo uno con una cantidad más elevada de enzima (40 μ g/ml). La transferencia Western confirmó adicionalmente dichos resultados al nivel de la proteína (figura 6g).

Con el fin de evaluar las eficiencias de unión enzimática, las células IMFE1 se incubaron con diferentes preparaciones de enzima (10 μ g/ml) a 4°C en presencia o en ausencia de M6P o manano. Tres horas después, se midió la α -gal A unida a la superficie celular mediante ensayo de la actividad enzimática. Bajo estas condiciones experimentales, no se detectó actividad de α -gal A superior al nivel de fondo (actividad de células no tratadas) en las células incubadas con aGal rico en man o agalsidasa alfa (figura 6h). La aGal de musgo presentaba una unión celular significativamente más elevada que aGal rico en man o agalsidasa alfa (figura 6h). La unión de aGal de musgo resultó significativamente bloqueada por el manano, pero no por M6P.

Dichos resultados mostraron que un sistema de ensayo con células endoteliales microvasculares en cultivo probablemente resulta más relevante a la ERT *in vivo* que los fibroblastos en cultivo; la unión e incorporación de

enzimas α -gal A de musgo resulta más eficiente que la agalsidasa alfa y esta unión/incorporación se produce mediante el RM. Estos datos *in vitro* sugieren además que los enzimas producidos en el musgo podrían resultar adecuados para la ERT *in vivo*. Debido a que la unión/incorporación de aGal de musgo resultaba más eficiente que la aGal rica en man, los presentes inventores seleccionaron el primero para los estudios animales posteriores.

Ejemplo 5.2: estudio de unión *in vitro*

Se incubaron células IMFE1 en placas multipocillo con enzimas α -gal A (10 μ g/ml) a 4°C en presencia o en ausencia de M6P 5 mM o 2 mg/ml de manano. Se utilizó el medio de cultivo EGM-2MV complementado con HEPES 25 mM. Tres horas después, las células se lavaron con PBS helado 4 veces y se lisaron directamente en Triton al 0.2% a 4°C. Se utilizaron los lisados para el ensayo de proteínas y el ensayo del enzima α -gal A.

Ejemplo 5.3: SDS-PAGE y transferencia Western:

Las muestras se desnaturalizaron en tampón para muestras de LDS (Invitrogen) con 2-mercaptoetanol al 2.5% a 70°C durante 10 min. Se utilizaron geles NuPAGE Bis-Tris al 4-12% o al 10% (Invitrogen) para la separación de las proteínas. Se llevó a cabo transferencia Western tal como se ha descrito anteriormente (Shen *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 369:1071-1075, 2008). Los anticuerpos primarios utilizados eran anticuerpo policlonal de conejo de α -gal A humana (Shire Human Genetic Therapies, Cambridge, MA), anticuerpo monoclonal de ratón de receptor de manosa (clon 15-2, Abcam, Cambridge, MA) y anticuerpo policlonal de cabra de GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se cuantificaron los niveles de proteína α -gal A mediante densitometría utilizando el software ImageJ.

Ejemplo 5.4: inmunofluorescencia

Se llevó a cabo inmunotinción de fluorescencia tal como se ha descrito anteriormente (Shen *et al.*, Mol. Genet. Metab. 95:163-168, 2008). Los anticuerpos primarios utilizados eran anticuerpos monoclonales de ratón de Gb₃ (Seikagaku, Tokyo, Japón) y receptor de manosa (clon 15-2, Abcam). Las células se contratiñeron con DAPI.

Ejemplo 5.5: animales y procedimientos

Se produjeron ratones Fabry mediante cría de pares de machos hemicigóticos y hembras homocigóticas. Se utilizaron ratones Fabry hembra adultas (3 a 6 meses de edad) durante todo el estudio. Para cada experimento, los ratones Fabry hembra resultaron más adecuados que los ratones Fabry macho debido a que los ratones macho presentan síntesis de Gb₃ inducida por testosterona en los riñones que confundía el efecto del enzima infundido en la degradación de Gb₃ acumulado. Para todas las inyecciones, se diluyeron las preparaciones de enzima en solución salina hasta un volumen total de 200 μ l por cada ratón y se inyectaron en ratones Fabry por la vena de la cola.

Ejemplo 5.6: farmacocinética plasmática

Las preparaciones enzimáticas se inyectaron a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (n= 5 cada uno). Las muestras sanguíneas se recogieron mediante sangrado de cola utilizando capilares heparinizados a 1, 5, 10, 20 y 30 minutos después de la inyección. Se separó el plasma y se midió la actividad de enzima α -gal A en el plasma.

Se inyectó aGal de musgo o agalsidasa alfa en ratones Fabry a través de una vena de la cola a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (BW), y se analizó la depuración de plasma mediante un ensayo de enzima α -gal A *in vitro*. La aGal de musgo se depuró más rápidamente de la circulación que la agalsidasa alfa (figura 7a). Para verificar que la vida media del plasma más corta de la aGal de musgo es debida a la recaptación más fuerte por tejidos en lugar de por la inactivación de enzima más rápida (desnaturación) en la circulación, se analizan los enzimas en plasma de ratón mediante transferencia western (figura 7b). De acuerdo con la reactividad superior del anticuerpo a aGal de musgo (figura 5b), se corrigieron las intensidades de las bandas de aGal de musgo mediante un factor de 2.14. Los resultados revelaron que los niveles de proteína α -gal A en ratones infundidos con aGal de musgo a 5 y 10 minutos tras la infusión son significativamente inferiores a los ratones inyectados con agalsidasa alfa (figura 7c). Los niveles de proteína de aGal de musgo a 5 y 10 minutos son 37% y 28% de los de la agalsidasa alfa respectivamente, que están de acuerdo aproximadamente con los datos de actividad de enzima (las actividades específicas en plasma de ratón inyectado con aGal de musgo en estos 2 puntos temporales son 49% y 28% de las de en los ratones inyectados con agalsidasa alfa). Además, existe una fuerte correlación entre los niveles de proteína y las actividades de enzima en el plasma (figura 7d). Junto con los hallazgos de estudio de captación *in vitro* (figuras 6f-h), estos datos sugieren que la aGal de musgo administrada intravenosamente es absorbida de manera eficaz por las células endoteliales vasculares y otros tipos de células en los tejidos cuando se compara con la agalsidasa alfa.

Ejemplo 5.7: Biodistribución

Las preparaciones de enzima se inyectaron a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (n=5 cada uno). Dos horas después de la inyección, los ratones se infundieron con solución salina (para extraer sangre) y se recolectaron corazón, riñones, bazo e hígado. Se homogeneizaron los órganos completos y se midió la actividad de α -gal A. Para el riñón, se agruparon ambos riñones y se homogeneizaron.

Dos horas después de la inyección intravenosa de aGal de musgo o agalsidasa alfa en ratones Fabry (1 mg/kg de peso corporal (BW)), se evaluó la distribución en los tejidos de cada preparación de enzima. Los riñones procedentes de ratones inyectados con aGal de musgo presentaban actividades enzimáticas significativamente más elevadas que agalsidasa alfa (figura 8a). Los niveles de aGal de musgo y de agalsidasa alfa en el corazón y en el bazo era comparables (figura 8a). El nivel de aGal de musgo en el hígado era significativamente inferior que el nivel de agalsidasa alfa (figura 8a). Se calcularon las actividades en órganos completos y se compararon las proporciones entre los diferentes órganos (figura 8b). Entre las actividades recuperadas totales, 94.9% de aGal de musgo y 97.5% de agalsidasa alfa fueron administradas en los hígados ($P < 0.05$). Los riñones de los ratones inyectados con aGal de musgo presentaban 1.96% de la actividad total, que es significativamente más elevada ($P < 0.05$) que la observada en ratones inyectados con agalsidasa alfa (0.58%). El análisis de transferencia Western confirmó la mayor incorporación de aGal de musgo en el riñón que agalsidasa alfa (figura 8c).

Con el fin de investigar la distribución celular de los enzimas infundidos, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de los ratones Fabry 24 horas después de la inyección de aGal de musgo o agalsidasa alfa a razón de 1 mg/kg BW. Las señales específicas mostraron un patrón citoplasmático granular, reflejando presumiblemente la localización lisosómica del enzima. La localización celular de dichos 2 enzimas en el corazón y en el riñón era esencialmente idéntica. En los corazones, tanto aGal de musgo como agalsidasa alfa fueron detectados en capilares y en células perivasculares, aunque no en miocitos (figura 9a). La tinción específica sólo se observó en células epiteliales tubulares corticales del riñón para cualquiera de los dos enzimas (figura 9b). Estos resultados son consistentes con la distribución celular de la agalsidasa alfa.

Ejemplo 5.8: inmunohistoquímica

Se inyectó aGal de musgo o agalsidasa alfa por la vena de la cola a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal (n=2 cada uno). Se recolectó corazón y riñones 1 día después de la infusión enzimática. Se utilizaron tejidos de ratón Fabry hembra no tratados a modo de controles negativos. Los tejidos se fijaron en formalina, se incluyeron en parafina y se llevaron a cabo secciones de 5 micrómetros. La inmunohistoquímica fue realizada por Histopathology and Tissue Shared Resource in Georgetown University (Washington, D.C.). Brevemente, tras la recuperación de epítomos inducida por calor en tampón de citrato, las secciones se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% y suero de cabra normal al 10% y se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo de α -gal A humano (Shire). Tras la incubación con anticuerpo secundario marcado con HRP, se detectaron las señales mediante cromógeno DAB y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Se verificó la especificidad de la señal con tinción de control, en la que se omitió la incubación con el anticuerpo primario. En comparación con la tinción ligera y difusa no específica en los controles no tratados, la señal específica mostró un patrón citoplasmático granular.

Ejemplo 5.9: estabilidad del tejido

Se inyectó aGal de musgo o agalsidasa alfa por la vena de la cola a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal. A las 24, 48 y 96 horas de la inyección, los ratones (n=4-5 en cada grupo) se perfundieron y se recolectaron los órganos y se homogeneizaron tal como se indica en la sección Biodistribución, anteriormente.

Ejemplo 5.10: cinética en los tejidos

Se investigó la cinética *in vivo* de aGal de musgo y agalsidasa alfa en diversos órganos después de una única inyección intravenosa. A las 2 y 24 horas de la inyección, los riñones de los ratones inyectados con aGal de musgo presentaban actividades enzimáticamente significativamente superiores a las de los ratones inyectados con agalsidasa alfa (figura 10a). Sin embargo, las actividades eran similares a las 48 y 96 horas (figura 10a). En el corazón, no se observaron diferencias significativas entre las dos formas de enzima a las 2 y 24 horas; sin embargo, las actividades de aGal de musgo eran inferiores a las de agalsidasa alfa 48 y 96 horas después de la inyección (figura 10b). En comparación con los ratones inyectados con agalsidasa alfa, los ratones inyectados con aGal de musgo presentaban un nivel similar de actividades en el bazo y actividades significativamente inferiores en el hígado en todos los puntos temporales analizados (figura 10c, d). Las semividas de aGal de musgo y agalsidasa alfa en el riñón y en el corazón eran de entre 2 y 3 días. aGal de musgo presentaba una semivida ~25% más corta en ambos órganos. La semivida de aGal de musgo en el hígado era significativamente más corta que la de la agalsidasa alfa (24 vs. 57 horas). Las semividas de ambas formas enzimáticas en el bazo eran similares (~30 horas).

Ejemplo 5.11: eliminación de Gb₃ tisular

Se utilizaron ratones Fabry hembra de seis meses de edad. Se inyectó aGal de musgo o agalsidasa alfa por la vena de la cola a dosis de 0.3, 1 y 3 mg/kg de peso corporal (n=4-5 cada uno). Se recolectó corazón, riñón e hígado 1 semana después de una única inyección. Se utilizaron ratones Fabry no tratados y WT de edades y sexos correspondientes a modo de controles (n=5). Los tejidos se homogenizaron y se sometieron a extracción de glucoesfingolípidos y posterior análisis de Gb₃ mediante espectrometría de masas tal como se ha indicado anteriormente (Durant *et al.*, J. Lipid Res. 52:1742-1746, 2011). Se analizaron ocho isoformas y los resultados mostrados son la suma de dichas isoformas. El contenido de Gb₃ se expresó en µg/mg de proteína total.

Se compararon las eficacias de aGal de musgo y agalsidasa alfa en la degradación de Gb₃ acumulado 7 días después de una única inyección intravenosa de cualquiera de los dos enzimas en ratones Fabry de 6 meses de edad. Se sometieron a ensayo tres dosis diferentes (0.3, 1 y 3 mg/kg de BW). Los ratones Fabry no tratados presentaban niveles de Gb₃ significativamente incrementados en riñón, corazón e hígado en comparación con los controles WT no tratados (figura 11a-c). Ambas formas enzimáticas redujeron Gb₃ en dichos órganos de una manera dependiente de la dosis (figura 11a-c). La aGal de musgo y la agalsidasa alfa presentaron una eficacia comparable en la eliminación de Gb₃ en riñones y corazón (figura 11a, b), excepto por una mejor eliminación de Gb₃ cardiaca de la agalsidasa alfa a la dosis más alta (3 mg/kg). En la eliminación de la Gb₃ hepática, la agalsidasa alfa resultó mucho más eficaz que aGal de musgo a las dosis de 0.3 y 1 mg/kg (figura 11c). A la dosis más elevada (3 mg/kg), dichos dos enzimas condujeron a niveles de Gb₃ hepático similares.

Ejemplo 6: administración de α-galactosidasa A humana recombinante producida por musgo en modelo de ratón de enfermedad de Fabry mediante vías no intravenosas

El objetivo de los presentes experimentos era someter a ensayo la potencial utilidad de las vías no intravenosas en la administración de αGal de musgo en los tejidos diana en el modelo de ratón.

Ejemplo 6.1: métodos

Se utilizó aGal de musgo tal como se indica en el ejemplo 1, a una concentración de 0.69 mg/ml. Se utilizaron ratones Fabry macho adultos (8 a 11 meses). Se inyectó aGal de musgo por las vías intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) o subcutánea (s.c.). Para las últimas dos vías, se inyectó enzima en los músculos de los muslos (ambos lados) y bajo la piel laxa entre los hombros, respectivamente. Se sometieron a ensayo dosis de 1, 3 o 10 mg/kg de peso corporal. Se extrajo sangre 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la inyección y se diseccionaron los órganos a las 24 horas. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la utilización. Se utilizó plasma de ratones Fabry no tratados (n=5) para la actividad de línea base. Se midieron las actividades de α-Gal A en plasma y tejidos mediante la utilización del método 4MU estándar.

Espectrometría: tras las reacciones enzimáticas, se midió la intensidad de fluorescencia de 4MU liberado mediante la utilización de SpectroMax M5 (Molecular Devices). Dicho equipo se utilizó para el análisis de muestras de ratones inyectados por las vías i.p. e i.m. (y todas las muestras sometidas a ensayo por los presentes inventores en los últimos 5 años). Sin embargo, debido a que se produjo recientemente un problema mecánico, para las muestras de ratones inyectados por vía s.c. la fluorescencia se midió mediante la utilización de SpectroMax Paradigm (Molecular Devices). La curva patrón de 4MU en SpectroMax Paradigm mostró una excelente linealidad y las actividades de α-gal A de tejidos y plasma de ratón analizados eran muy próximas a las medidas previamente mediante la utilización de SpectroMax M5 (analizando las mismas muestras). Por lo tanto, la variación de los datos mediante la utilización de 2 espectrometrías diferentes en el presente estudio debería ser muy pequeña.

Ejemplo 6.2: resultados y comentarios:

Vía i.p. (figura 12): las actividades plasmáticas alcanzaron un pico en 0.5 a 2 horas después de la inyección, se redujeron a continuación y volvieron al nivel de base a las 6 horas. Las actividades eran dependientes de la dosis. Las actividades en corazón, riñón, hígado y bazo se incrementaron de una manera dependiente de la dosis.

Vía i.m. (figura 13): las actividades plasmáticas alcanzaron un pico 0.5 horas después de la inyección, se redujeron rápidamente después y volvieron al nivel de línea base a las 4 horas. Las actividades en corazón, riñón, hígado y bazo se incrementaron de una manera dependiente de la dosis. Un ratón (nº 14, con una dosis de 10 mg/kg) presentó actividades tisulares marcadamente más elevadas que otros en el mismo grupo; esta muestra fue descartada del análisis de los datos.

Vía s.c. (figura 14): las actividades plasmáticas mostraron un patrón similar a la administración i.m. Globalmente, las actividades tisulares se incrementaron de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia sustancial en las actividades de corazón y riñón entre las dosis de 1 y 3 mg/kg; ello podría deberse a una tasa de absorción relativamente limitada de dicha vía. A la dosis de 10 mg/kg, las actividades tisulares mostraron variaciones elevadas; 2 de cada 5 ratones presentó actividades drásticamente más elevadas que el resto.

Ejemplo 6.3: comparaciones

La eficiencia de administración del enzima se observó que presentaba el orden siguiente: i.p. > s.c. > (o similar) i.m.

i.p. vs. i.v.: las actividades de α -Gal en corazón, riñón, hígado y bazo en ratones inyectados por vía i.p. (1 mg/kg) fueron de 16%, 49%, 17% y 35% las de los ratones inyectados por vía i.v. (datos del estudio de estabilidad en los tejidos, 1 mg/kg, 24 horas después de la inyección).

s.c. vs. i.p./i.v.: aunque la inyección s.c. condujo a menor administración de enzima en los tejidos que la inyección i.p., la proporción de reducción en los diferentes órganos no fue proporcional. A la dosis de 1 mg/kg, las actividades de α -gal A en corazón, riñón, hígado y bazo en ratones inyectados por vía s.c. era 67%, 43%, 22% y 24% las de los ratones inyectados por vía i.p. Lo anterior sugiere que la vía s.c. tiende a administrar más enzima en corazón y riñones que en hígado y bazo. Se observó un patrón similar en comparación con la administración i.v. Las actividades en los órganos anteriormente indicados de la inyección s.c. fueron 11%, 21%, 4% y 9% las de los ratones inyectados por vía i.v.

Las vías no i.v. son un enfoque alternativo para la ERT. La vía i.p. aparentemente es un buen método. Al considerar la utilización en seres humanos, la vía s.c. podría ser un buen candidato. Aunque las cantidades tisulares son menores que en la administración i.v., pueden administrarse cantidades suficientes ya que sólo se requieren cantidades bajas en los tejidos. En el caso de que las actividades tisulares (por ejemplo, s.c. vs. i.v.) de una única administración resulten insuficientes para degradar la G3 acumulada en corazón y riñones, las inyecciones repetidas podrían superar este problema. En resumen, los aspectos positivos de la administración i.p., i.m. y s.c. probablemente tales como la aceptación mejorada del paciente superan la distribución reducida en los tejidos diana.

Ejemplo 7: comentario

Según las características de las proteínas, así como su aplicación planificada, se seleccionan diferentes huéspedes de expresión. Mientras que las proteínas en masa para aplicaciones industriales y alimentarias/piensos se expresan mayoritariamente en huéspedes procarióticos, tales como *Escherichia coli*, la producción de proteínas farmacéuticas con frecuencia se basa en la expresión en células eucarióticas superiores, tales como, por ejemplo, células CHO (ovario de hámster chino) o células vegetales. Las últimas selecciones se basan principalmente en el hecho de que las proteínas farmacéuticas, al ser la mayoría de origen humano, requieren modificaciones postraduccionales (MPT) complejas, tales como, por ejemplo, N-glucosilaciones. Por lo tanto, la expresión recombinante en paralelo de las mismas proteínas en diferentes sistemas de expresión eucariótica rinde diferentes calidades de producto con respecto a las MPT. Por ejemplo, en el caso de la N-glucosilación, los sistemas de expresión de células de mamífero tienden a rendir una mezcla de productos muy heterogénea, con varias decenas a centenares de diferentes especies de N-glicano en el mismo producto de proteína. Los sistemas de expresión vegetales, en contraste, muestran un patrón de N-glucosilación muy homogéneo, con la presencia de únicamente unas cuantas (típicamente menos de diez) especies de glicano diferentes en la proteína producida.

En el caso de la producción de proteínas farmacéuticas, la selección del sistema de producción con frecuencia resulta inducida por las exigencias estructurales y de calidad del producto. La presente invención se ha visto motivada por la necesidad de producir una proteína lisosómica recombinante para tratar pacientes que sufren de LSD. Debido a que estos pacientes no disponen de la versión funcional de dicho enzima debido a la mutación génica hereditaria, se utiliza el producto recombinante como sustitución mediante terapia de sustitución enzimática periódica (por ejemplo, infusión intravenosa). Para la incorporación eficiente a partir del torrente sanguíneo mediante unión al receptor de manosa sobre la superficie de las células diana, el enzima necesita encontrarse decorado con N-glicanos que portan residuos de manosa terminales.

Con el fin de producir una versión de aGal con N-glicanos terminados en manosa en un sistema de expresión vegetal, el método rutinario utilizará la administración dirigida a vacuolas de la proteína mediante la adición de una señal de secreción al extremo N-terminal y una señal de administración dirigida vacuolar al extremo C. En este enfoque, la señal de secreción dirige la proteína naciente al retículo endoplasmático (RE), donde es decorada con los glicanos precursores. Tras la ruta secretora por defecto, la proteína es transportada al aparato de Golgi y sus glicanos son recortados adicionalmente y procesados hasta una forma de N-glicano vegetal compleja típica. Estos glicanos terminan en dos residuos terminales de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que cubre ambos extremos posibles de manosa de dicho glicano.

La exposición de dichas dos manosas en las posiciones penúltimas de los dos brazos de glicano seguidamente se consigue con el segundo péptido de administración dirigida, la señal de administración dirigida vacuolar en el extremo C. Este péptido se une a receptores de clasificación vacuolar en la red del trans-Golgi (RTG) e inicia la administración dirigida de la proteína unida a la vacuola. En ésta, la beta-N-acetilhexosaminidasa escinde los GlcNAc terminales y de esta manera expone los residuos de manosa. Los glicanos resultantes se clasifican como "paucimanosídicos" y son típicos de las proteínas vacuolares vegetales.

La presente invención, en contraste, omite la etapa de incorporar una señal vacuolar C-terminal en la secuencia de las proteínas. Por lo tanto, el producto recombinante no se clasifica hacia la vacuola en la RTG, aunque además sigue la ruta secretora por defecto. En este enfoque, no se prevé el recorte de los N-glicanos complejos y la exposición asociada de las manosas terminales, ya que las estructuras paucimanosídicas se asignan a ser específicas vacuolares (Castilho y Steinkellner, *Biotechnology Journal* 7(9):1088-1098, 2012).

La presente invención consiguió el recorte de los N-glicanos en los briófitos, generando una versión recombinante de proteínas lisosómicas con manosas terminales expuestas en sus N-glicanos sin una señal vacuolar. Lo anterior condujo a una ruta secretora que, aunque es independiente del procesamiento vacuolar de glicoles, condujo a un producto con cantidades elevadas de glucoproteínas paucimanosídicas en el caso de las proteínas lisosómicas.

La aGal de musgo resultó eficientemente incorporada por las células endoteliales que expresaban RM, y esta incorporación resultó bloqueada por manano de levadura, un inhibidor específico de endocitosis mediada por RM. La aGal de musgo no resultó eficazmente incorporada por los fibroblastos de piel humana, que no expresan RM. Estos resultados indican que la incorporación de aGal de musgo está mediada por RM. En contraste, la incorporación de agalsidasa alfa implicaba tanto RM como M6PR. Los estudios animales revelaron que la actividad enzimática y la capacidad de eliminación del almacenamiento de aGal de musgo en corazones y riñones de ratón son globalmente comparables a los de la agalsidasa alfa. Estos resultados sugieren que los enzimas terminados en manosa pueden resultar tan eficaces como los enzimas que alojan M6P en el tratamiento de la enfermedad de Fabry y en otras LSD.

La aGal de musgo sometida a ensayo resulta idéntica a su contrapartida humana con respecto a la secuencia y estructura de la proteína. La N-glicosilación homogénea y predominantemente terminada en manosa se consigue mediante la expresión en una cepa de musgo personalizada. Además, para la producción de aGal rica en man, se ha inactivado la GNT-I (N-acetiltransferasa-glucosaminiltransferasa I). La transferencia de una N-acetilglucosamina al glicano naciente por este enzima forma un sustrato esencial para su procesamiento adicional en formas complejas. Por lo tanto, el procesamiento de glicanos complejos resulta bloqueado en esta forma inactivada y todas las glicofomas son del tipo rico en man.

El estudio de los presentes inventores mostró que el musgo es una plataforma útil para expresar α -gal A y otros enzimas lisosómicos. En un aspecto, el musgo por sí mismo muestra una N-glicosilación extraordinariamente homogénea, es decir, en comparación con, por ejemplo, células de mamífero, sus proteínas muestran un número drásticamente reducido de glucoformas con una distribución porcentual altamente reproducible. Con respecto a la producción farmacéutica, lo anterior resulta altamente ventajoso en casos en los que las calidades de los N-glicanos son decisivas para la eficacia terapéutica de una proteína.

La incorporación de aGal de musgo por las células endoteliales resultó mucho más eficiente que la de agalsidasa alfa. Lo anterior fue consistente con la eliminación más rápida de aGal de musgo infundida respecto de la circulación *in vivo*. Dado que las células endoteliales desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la vasculopatía y otras manifestaciones en la enfermedad de Fabry, la administración eficaz en las células endoteliales resulta ventajosa para prevenir y corregir la patología de la enfermedad. El estudio de los presentes inventores mostró además que, a pesar de los residuos de manosa terminal incrementados, la unión/incorporación de aGal rica en man a células endoteliales resultó significativamente menos eficiente que aGal de musgo paucimanosídica. Lo anterior sugiere que la eficiencia de unión de RM posiblemente depende más de la conformación de los glicanos, en lugar del número absoluto de residuos de manosa expuestos.

Mediante inmunohistoquímica, se detectó aGal de musgo en endotelio vascular y células perivasculares en el corazón, que es globalmente consistente con el patrón de distribución de RM. Es conocido que los cardiomiocitos endocitan ligandos manosilados mediante receptores RM o de tipo RM. Aunque no se detectó el enzima en las células musculares, la Gb₃ cardíaca significativamente reducida (decremento de ~45% en ratones Fabry que habían recibido 1.0 o 3.0 mg/kg de aGal de musgo) sugiere que la pequeña cantidad de enzima que se encuentra bajo el límite de detección del método de inmunotinción de los presentes inventores podría haberse administrado en los cardiomiocitos. En el riñón, aGal de musgo sólo se detectó en las células epiteliales tubulares. No se conoce cuál es el mecanismo de incorporación, ya que no se ha informado de que los túbulos renales expresen RM. Una interpretación potencial es que las células tubulares expresan otro u otros receptores que median en la endocitosis de glucoproteínas terminados en manosa. La presencia de dicho receptor o receptores no identificados que presenta actividad e unión de tipo RM se ha informado en bazo murino y ganglio linfático. La reabsorción de enzimas filtrados por las células tubulares mediante endocitosis mediada por megalina es otra posibilidad.

La aGal de musgo y la agalsidasa alfa mostraban diferentes distribuciones en los tejidos en el análisis de 2 horas después de la infusión. Respecto a la agalsidasa alfa, la administración dirigida de aGal de musgo en el riñón resultó significativamente potenciada y la administración en el hígado, significativamente reducida. Dicho patrón de distribución de aGal de musgo resulta ventajosa, ya que el riñón es uno de los órganos principalmente afectados en dicha enfermedad. En el hígado, la agalsidasa alfa infundida se administra tanto en hepatocitos como en células de revestimiento de seno (células del endotelio y/o de Kupffer), presumiblemente mediante M6PR,

receptores de asialoglucoproteína y RM. La mayor parte de M6PR accesible al enzima fosforilado infundido se encuentra contenido en el hígado. En contraste, aGal de musgo se administra preferentemente en células endoteliales y de Kupffer mediante el RM.

- 5 La semivida de aGal de musgo internalizado en el corazón y riñón fue más corta que la agalsidasa alfa. Lo anterior probablemente está relacionado con que el menor contenido de carbohidratos en aGal de musgo puede conducir a una mayor susceptibilidad del enzima a la degradación proteolítica en los lisosomas. Debido a la más rápida renovación, la actividad de aGal de musgo en el riñón 4 días después de la infusión era similar a la de la agalsidasa alfa. La reducción del almacenamiento de Gb₃ en el riñón y corazón era paralela a las actividades enzimáticas
- 10 residuales 4 días después de la inyección.

- La comparación de aGal de musgo y agalsidasa alfa puede servir como un modelo útil para el estudio de las funciones de M6PR y MR en la incorporación en tejidos de la agalsidasa alfa. Tal como se ha mencionado, tanto M6PR como RM median en la administración de agalsidasa alfa *in vitro*; de esta manera, resulta difícil determinar qué ruta de receptores es más responsable de la biodistribución y de la respuesta terapéutica de dicho enzima en
- 15 determinados órganos diana. A pesar de las cadenas sacáridas marcadamente diferentes, la localización celular de la agalsidasa alfa y la aGal de musgo en el corazón y riñón asimismo eran inesperadamente similares. En otras palabras, en comparación con un enzima completamente no fosforilado, los residuos M6P en la agalsidasa alfa no condujeron a una distribución más amplia y a una eliminación más completa de Gb₃, tal como se esperaría. Estos
- 20 resultados sugieren que la ruta de RM podría desempeñar un papel más importante que M6PR en la administración dirigida de la agalsidasa alfa al corazón y a los riñones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> greenovation Biotech GmbH

5 <120> Proteínas lisosómicas glucosiladas, método de producción y utilizaciones

<130> r68744

<150> EP15159443.9

10 <151> 2015-03-17

<160> 9

<170> Patent In versión 3.5

15 <210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> señal vacuolar

<400> 1

Val Asp Thr Met

1

25 <210> 2

<211> 4

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de señal de retención de ER

35 <400> 2

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 3

<211> 398

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp

1 5 10 15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys

20 25 30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu

35 40 45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp

45

ES 2 899 783 T3

50		55		60											
Met	Ala	Pro	Gln	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Arg	Leu	Gln	Ala	Asp	Pro	Gln
65					70					75					80
Arg	Phe	Pro	His	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Asn	Tyr	Val	His	Ser	Lys
			85						90					95	
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Val	Gly	Asn	Lys	Thr	Cys	Ala
			100					105					110		
Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Phe	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe
		115					120					125			
Ala	Asp	Trp	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	Cys	Tyr	Cys	Asp
130						135					140				
Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	His	Met	Ser	Leu	Ala	Leu
145					150					155					160
Asn	Arg	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Val	Tyr	Ser	Cys	Glu	Trp	Pro	Leu	Tyr
				165					170						175
Met	Trp	Pro	Phe	Gln	Lys	Pro	Asn	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Cys
			180					185					190		
Asn	His	Trp	Arg	Asn	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ser	Trp	Lys	Ser	Ile
		195					200					205			
Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Trp	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Glu	Arg	Ile	Val	Asp
	210					215					220				
Val	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Val	Ile	Gly
225					230					235					240
Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Gln	Met	Ala	Leu	Trp
				245					250					255	
Ala	Ile	Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Phe	Met	Ser	Asn	Asp	Leu	Arg	His	Ile
			260					265					270		
Ser	Pro	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Ala	Ile
		275					280					285			
Asn	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	Lys	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu	Arg	Gln	Gly	Asp
290						295					300				

ES 2 899 783 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 1197

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

ttggataatg gattggctag aactcctact atgggatggt tgcattggga gagattcatg	60
tgcaacttgg actgccaaga ggaacctgat tcttgcatct ctgagaagct gttcatggaa	120
atggctgagt tgatggtgtc tgagggatgg aaggatgctg gatacgagta cttgtgcatt	180
gatgattgct ggatggctcc tcagagagat tctgaggga gattgcaggc tgatcctcag	240
agattccctc atggaattag gcagttggct aactacgtgc actctaaggg attgaagttg	300
ggcatctacg ctgatgtggg aaacaagact tgcgctggat tccctggatc tttcggctac	360
tacgatattg acgctcagac tttcgctgat tggggagtgg atttgttgaa gttcgatgga	420
tgctactgcg acagcttgga gaatttggt gatggataca agcacatgag cttggctttg	480
aataggactg gacggtctat tgtgtactct tgcgagtggc ctctgtacat gtggcctttc	540
cagaagccta actacactga gattaggcag tactgcaacc actggcgaaa cttcgctgat	600
atcgatgact cttggaagtc catcaagtct atcctggatt ggaccagctt caatcaagag	660
cgaattgtgg atgtggctgg acctggtgga tggaatgac ctgatatgtt ggtgatcggg	720
aacttcggac tgtcttgga tcagcaagtg actcagatgg ctctgtgggc tattatggct	780
gctcctttgt tcatgagcaa cgatttgagg catattagcc ctcaggctaa ggctttgttg	840
caggataagg atgtgatcgc tatcaaccag gatcctttgg gaaagcaggg ataccagttg	900
agacagggtg ataatttcga ggtgtgggag aggcctttgt ctggattggc ttgggctgtg	960
gctatgatta acagacaaga gattggaggc cctcgagct atacaattgc tgtggcttct	1020
ttgggaaagg gtgtggcttg caatcctgct tgcttcatta ctcagttgtt gccgtgaag	1080
aggaagttgg gattctacga gtggacttct aggttgcggt cacacattaa ccctactgga	1140
actgtgttgc tgcagttgga gaacactatg cagatgagct tgaaggatct gctgtga	1197

<210> 5

<211> 26

10

ES 2 899 783 T3

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 5

Met Ala Phe Tyr Lys Ile Ser Ser Val Phe Phe Ile Phe Cys Phe Phe
1 5 10 15

Leu Ile Ala Leu Pro Phe His Ser Tyr Ala
20 25

<210> 6

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys
1 5 10 15

Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg
35 40 45

Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr Gly Thr Gly
50 55 60

Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly
65 70 75 80

Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu
85 90 95

Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu
100 105 110

Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe
115 120 125

Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu

ES 2 899 783 T3

130		135		140
His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu				
145		150		155
				160
Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala				
		165		170
				175
Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn				
		180		185
				190
Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr				
		195		200
				205
Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys				
		210		215
				220
Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu				
		225		230
				235
Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro Glu His Gln				
		245		250
				255
Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr				
		260		265
				270
His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu				
		275		280
				285
Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr				
		290		295
				300
Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala				
		305		310
				315
Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu				
		325		330
				335
Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val				
		340		345
				350
Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile				
		355		360
				365
Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala				
		370		375
				380

ES 2 899 783 T3

Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe Val Asp Ser
385 390 395 400

Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met
405 410 415

Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln
420 425 430

Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala
435 440 445

Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu Asn Arg Ser
450 455 460

Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu
465 470 475 480

Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg
485 490 495

Gln

<210> 7

<211> 1494

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

gccccccct gcatccctaa gagcttcggc tacagctcgg tgggtgtgtgt ctgcaatgcc	60
acatactgtg actcctttga cccccgacc tttcctgccc ttggtacctt cagccgctat	120
gagagtacac gcagtgggcg acggatggag ctgagtatgg ggcccatcca ggctaatac	180
acgggcacag gcctgctact gaccctgcag ccagaacaga agttccagaa agtgaaggga	240
tttgaggagg ccatgacaga tgctgctgct ctcaacatcc ttgccctgtc accccctgcc	300
caaaatttgc tacttaaatc gtacttctct gaagaaggaa tcggatataa catcatccgg	360
gtacccatgg ccagctgtga cttctccatc cgcacctaca cctatgcaga caccctgat	420
gatttccagt tgcacaactt cagcctccca gaggaagata ccaagctcaa gataccctg	480
attcaccgag ccctgcagtt ggcccagcgt cccgtttcac tccttgccag cccctggaca	540
tcaccactt ggctcaagac caatggagcg gtgaatggga aggggtcact caagggacag	600
cccgagaca tctaccacca gacctgggcc agatactttg tgaagttcct ggatgcctat	660
gctgagcaca agttacagtt ctgggcagtg acagctgaaa atgagccttc tgctgggctg	720
ttgagtggat accccttcca gtgcctgggc ttcacccttg aacatcagcg agacttcatt	780

ES 2 899 783 T3

gccctgacc taggtcctac cctcgccaac agtactcacc acaatgtccg cctactcatg 840
 ctggatgacc aacgcttgct gctgccccac tgggcaaagg tgggtactgac agaccagaa 900
 gcagctaaat atgttcatgg cattgctgta cattggtacc tggactttct ggctccagcc 960
 aaagccaccc taggggagac acaccgcctg ttccccaaca ccatgctctt tgcctcagag 1020
 gcctgtgtgg gctccaagtt ctgggagcag agtgtgcggc taggctcctg ggatcgaggg 1080
 atgcagtaca gccacagcat catcacgaac ctctgtacc atgtgggtcgg ctggaccgac 1140
 tggaaccttg ccctgaaccc cgaaggagga cccaattggg tgcgtaactt tgtcgacagt 1200
 cccatcattg tagacatcac caaggacagc ttttaccaaac agcccatgtt ctaccacctt 1260
 ggccacttca gcaagttcat tctgagggc tcccagagag tggggctggt tgccagtcat 1320
 aagaacgacc tggacgcagt ggcactgatg catcccgatg gctctgctgt tgtggctcgtg 1380
 ctaaaccgct cctctaagga tgtgcctctt accatcaagg atcctgctgt gggcttcctg 1440
 gagacaatct cacctggcta ctccattcac acctacctgt ggcgtcgcca gtga 1494

<210> 8

<211> 896

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro
 1 5 10 15

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

Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu
 35 40 45

Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala
 50 55 60

Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr
 65 70 75 80

Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu
 85 90 95

Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg
 100 105 110

Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys
 115 120 125

ES 2 899 783 T3

Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val
 130 135 140
 His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu
 145 150 155 160
 Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu
 165 170 175
 Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu
 180 185 190
 Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu
 195 200 205
 Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn
 210 215 220
 Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu
 245 250 255
 Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu
 260 265 270
 Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly
 275 280 285
 Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr
 290 295 300
 Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp
 305 310 315 320
 Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr
 325 330 335
 Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met
 340 345 350
 Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe
 355 360 365
 Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met

ES 2 899 783 T3

370		375		380
Ile Val Asp Pro Ala	Ile Ser Ser Ser Gly	Pro Ala Gly Ser Tyr Arg		
385	390	395		400
Pro Tyr Asp Glu Gly	Leu Arg Arg Gly	Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr		
	405	410		415
Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp	Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro			
	420	425		430
Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala				
	435	440		445
Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn				
	450	455		460
Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn				
	465	470		475
Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu				
	485	490		495
Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His				
	500	505		510
Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His				
	515	520		525
Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg				
	530	535		540
Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp				
	545	550		555
Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu				
	565	570		575
Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly				
	580	585		590
Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu				
	595	600		605
Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu				
	610	615		620

ES 2 899 783 T3

Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg
 625 630 635 640
 Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu
 645 650 655
 Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe
 660 665 670
 Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu
 675 680 685
 Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys
 690 695 700
 Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln
 705 710 715 720
 Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala
 725 730 735
 Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro
 740 745 750
 Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile
 755 760 765
 Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro
 770 775 780
 Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu
 785 790 795 800
 Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala
 805 810 815
 Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu
 820 825 830
 Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val
 835 840 845
 Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly
 850 855 860
 Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp
 865 870 875 880
 Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
 885 890 895

5 <210> 9
 <211> 2691
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 899 783 T3

<400> 9

cagcagggag ccagcagacc agggcccccg gatgccagg cacaccccg cgtcccaga	60
gcagtgccca cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct tcgattgcgc ccctgacaag	120
gccatcacc aggaacagtgc cgaggcccg gcgtgttgct acatccctgc aaagcagggg	180
ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc cccccagcta cccagctac	240
aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg ccaccctgac ccgtaccacc	300
cccaccttct tccccaaaga catcctgacc ctgcggctgg acgtgatgat ggagactgag	360
aaccgcctcc acttcacgat caaagatcca gctaacaggc gctacgaggt gcccttggag	420
acccgcgatg tccacagccg ggcaccgtcc ccactctaca gcgtggagtt ctccgaggag	480
cccttcgggg tgatcgtgcg ccggcagctg gacggcccg tgctgctgaa cacgacggtg	540
gcgcccctgt tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca cctcgctgcc ctgcagtat	600
atcacaggcc tcgccgagca cctcagtcct ctgatgctca gcaccagctg gaccaggatc	660
accctgtgga accgggacct tgcgccacg cccggtgcga acctctacgg gtctcacctc	720
ttctacctgg cgctggagga cggcggtcg gcacacgggg tgctcctgct aaacagcaat	780
gccatggatg tggcctgca gccagccct gcccttagct ggaggtcgac aggtgggatc	840
ctggatgtct acatcttctt gggcccagag cccaagagcg tgggtgcagca gtacctggac	900
gttgtgggat acccgttcat gccgccatc tggggcctgg gcttccacct gtgccgctgg	960
ggctactcct ccaccgctat caccgccag gtggtggaga acatgaccag ggcccacttc	1020
cccctggacg tccagtggaa cgacctggac tacatggact cccggaggga cttcacgttc	1080
aacaaggatg gcttccggga cttcccgcc atggtgcagg agctgcacca gggcgcccg	1140
cgctacatga tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg gccctgccgg gagctacagg	1200
ccctacgacg agggctctgcg gaggggggtt ttcatcacca acgagaccgg ccagccgctg	1260
attggaagg tatggcccg gtccactgcc tccccgact tcaccaacct cacagccctg	1320
gcctggtggg aggacatggt ggctgagttc catgaccagg tgcccttcga cggcatgtgg	1380
attgacatga acgagccttc caacttcac aggggctctg aggacggctg cccaacaat	1440
gagctggaga acccaccta cgtgcctggg gtggttgggg ggaccctca ggcggccacc	1500
atctgtgcct ccagccacca gtttctctcc acacactaca acctgcacaa cctctacggc	1560

ES 2 899 783 T3

ctgaccgaag ccatcgccctc ccacagggcg ctggtgaagg ctcgggggac acgcccattt	1620
gtgatctccc gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg ccggccactg gacgggggac	1680
gtgtggagct cctgggagca gctcgccctcc tccgtgccag aaatcctgca gtttaacctg	1740
ctgggggtgc ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggttcc tgggcaacac ctgagaggag	1800
ctgtgtgtgc gctggacca gctgggggccc ttctaccctc tcatgcgga ccacaacagc	1860
ctgctcagtc tgcccagga gccgtacagc ttcagcgagc cggcccagca ggccatgagg	1920
aaggccctca ccctgcgcta cgcactcctc cccacactct acacactgtt ccaccaggcc	1980
cacgtcgagg gggagaccgt ggcccgcccc ctcttcctgg agttcccaa ggactctagc	2040
acctggactg tggaccacca gtcctgtgg ggggaggccc tgctcatcac ccagtgctc	2100
caggccggga aggccgaagt gactggctac ttccccctgg gcacatggtc cgacctgcag	2160
acggtgccag tagaggccct tggcagcctc ccacccccac ctgcagctcc ccgtgagcca	2220
gcatccaca gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc ccctggacac catcaacgtc	2280
cacctccggg ctgggtacat catccccctg caggccctg gcctcacaac cacagagtcc	2340
cgccagcagc ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg gtggggaggc ccgaggggag	2400
ctgttctggg acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc gaggggccta cacacaggtc	2460
atcttcctgg ccaggaataa cacaatcgtg aatgagctgg tacgtgtgac cagtgaggga	2520
gctggcctgc agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg ccacggcgcc ccagcaggtc	2580
ctctccaacg gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc ccgacaccaa ggtcctggac	2640
atctgtgtct cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca gctggtgtta g	2691

REIVINDICACIONES

1. Método de fabricación de una composición de proteína lisosómica, que comprende expresar un transgén que codifica una proteína lisosómica en una planta o célula de briófitas, en el que dicha proteína lisosómica se expresa con una señal secretora N-terminal, en el que dicha señal secretora se elimina opcionalmente durante el procesamiento intracelular, y en el que la proteína lisosómica carece de una señal vacuolar C-terminal con la secuencia VDTM (SEC ID nº 1) y carece de una señal de retención de ER C-terminal con la secuencia KDEL (SEC ID nº 2), y dicho método comprende además obtener una proteína lisosómica expresada a partir de dicha planta o célula.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína lisosómica expresada se obtiene a partir de la materia secretada de la planta o célula.

3. Método según la reivindicación 2, en el que la proteína lisosómica expresada se obtiene a partir de materia secretada de la planta o célula sin disrupción de las células o la planta productoras.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína lisosómica carece de cualquier secuencia de señal de retención de ER C-terminal y/o carece de cualquier secuencia de señal vacuolar C-terminal.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína lisosómica comprende una secuencia de aminoácidos expresada que termina en el extremo C con los aminoácidos de una proteína lisosómica nativa o un truncamiento de la misma.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta o célula de briófitas es un musgo, preferentemente *P. patens*, planta o célula, y/o en el que la planta o célula de briófitas tiene suprimida o eliminada la alfa-1,3-fucosiltransferasa y/o beta-1,2-xilosiltransferasa.

7. Composición de proteína lisosómica que comprende una pluralidad de proteínas lisosómicas que están glucosiladas según un patrón de glucosilación, en la que dicho patrón de glucosilación presenta por lo menos 45% de N-glicanos paucimanosídicos (% molar).

8. Composición de proteína lisosómica según la reivindicación 7 obtenible mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Composición de proteína lisosómica según la reivindicación 7 u 8, en la que la proteína lisosómica es una cualquiera seleccionada de entre α -galactosidasa, preferentemente α -galactosidasa A (GLA); β -glucocereamidasa, β -glucosidasa (glucocerebrosidasa); α -manosidasa; aspartilglucosaminidasa; β -manosidasa; ceramidasa ácida; α -fucosidasa; β -galactosidasa, proteína activadora de β -hexosaminidasa; galactocerebrosidasa, galactoceramidasa; lipasa ácida lisosómica (LAL); α -iduronidasa; iduronato-2-sulfatasa; glucosamina-N-sulfatasa, heparansulfatosulfamidasa (SGSH); α -N-acetil-glucosaminidasa (NAGLU); α -glucosaminidasa-N-acetiltransferasa; N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa; β -galactosidasa; N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa; β -glucuronidasa; neuraminidasa; esfingomielinasa, esfingomielina fosfodiesterasa; alfa-1,4-glucosidasa ácida; β -hexosaminidasa, o su subunidad α ; alfa-N-acetilgalactosaminidasa (NAGA), α -galactosaminidasa; β -hexosaminidasa A; galactosa-6-sulfato sulfatasa; hialuronidasa.

10. Composición de proteína lisosómica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que las proteínas lisosómicas presentan uno o más N-glicanos paucimanosídicos que comprenden la estructura de fórmula 1:



(fórmula 1)

en la que un cuadrado representa N-acetilglucosamina (GlcNAc), un círculo representa manosa (Man) y un círculo con una T representa una manosa terminal, en la que una o más de las subunidades de GlcNAc o Man pueden estar α 1,3-fucosiladas, α 1,6-fucosiladas y/o β 1,2-xilosiladas, preferentemente en la que por lo menos 10% de los N-glicanos de las proteínas lisosómicas de la composición comprende o consiste en la estructura de fórmula 1 (% molar).

11. Composición de proteína lisosómica según la reivindicación 10, en la que el patrón de glucosilación presenta por lo menos 1% de N-glicanos de la fórmula GlcNAc₂-Hex₂-metil-Hex; y/o en la que el patrón de glucosilación comprende los N-glicanos siguientes:

- 5 0% a 35%, preferentemente 1% a 30%, -GlcNAc₂-(Man₂metil-Hex);
 30% a 80%, preferentemente 40% a 70%, -GlcNAc₂-Man₃;
 0% a 30%, preferentemente 4% a 22%, -GlcNAc₂-Man₃-GlcNAc;
 0% a 15%, preferentemente 2% a 12%, -GlcNAc₂-Man₃-GlcNAc₂;
 0% a 5%, preferentemente 0% a 3%, -GlcNAc₂-Man₃-Hex₂;
 10 0% a 11%, preferentemente 1% a 8%, -GlcNAc₂-Man₃-Hex₃;
 0% a 10%, preferentemente 1% a 7%, -GlcNAc₂-Man₃-Hex₄;
 0% a 10%, preferentemente 1% a 7%, -GlcNAc₂-Man₃-Hex₅;

en la que la totalidad de estos compuestos juntos ascienden a 100% o menos de 100%,

- 15 en la que GlcNAc es una subunidad de N-acetilglucosamina, Man es una subunidad de manosa, Hex es una subunidad de hexosa, metil-Hex es una subunidad de hexosa metilada, preferentemente 2-O-metil hexosa; con la condición de que -GlcNAc₂-(Man₂metil-Hex) y -GlcNAc₂-Man₃ juntos ascienden a por lo menos 45%, (todos los % son % molares),

- 20 especialmente se prefiere en la que Hex es Man en cualquiera de los N-glicanos anteriores;

- en la que GlcNAc en el extremo reductor del glicano puede estar fucosilada o no está fucosilada en cualquiera de los N-glicanos anteriores; en la que una Man en un punto de ramificación, está xilosilada o no está xilosilada en cualquiera de los N-glicanos anteriores.

- 25 12. Composición de proteína lisosómica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 que comprende proteínas lisosómicas no fosforiladas.

- 30 13. Célula de o planta briófitas adecuada para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende un transgén que codifica una proteína lisosómica tal como se define en la reivindicación 1, preferentemente tal como se define asimismo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

- 35 14. Método *in vitro* de procesamiento de una proteína lisosómica que comprende un N-glicano complejo, comprendiendo dicho método proporcionar la proteína lisosómica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en una muestra y poner en contacto la muestra con un enzima HEXO de briófitas, preferentemente HEXO3, escindiendo así el enzima HEXO de briófitas los residuos de Glc-NAc terminales de la proteína lisosómica, produciendo de esta manera un N-glicano paucimanosídico.

- 40 15. Composición de proteína lisosómica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 para la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende administrar la composición de proteína lisosómica a un paciente, preferentemente en la que la enfermedad y la proteína lisosómica se selecciona de la tabla siguiente:

Enfermedad	Proteína lisosómica
Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A (GLA)
Enfermedad de Gaucher	β -Glucocereamidasa, β -glucosidasa (glucocerebrosidasa)
Alfa-manosidosis	α -Manosidasa
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Beta-manosidosis	β -Manosidasa
Enfermedad de Farber	Ceremidasa ácida
Fucosidosis	α -Fucosidasa
GM1-Gangliosidosis	β -Galactosidasa, proteína activadora de β -hexosaminidasa
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa; galactocereamidasa
Deficiencia de lipasa ácida lisosómica (LAL)	Lipasa ácida lisosómica (LAL)
Mucopolisacaridosis	α -Iduronidasa
	Iduronato-2-sulfatasa
	Glucosamina-N-sulfatasa; heparansulfatosulfamidasa (SGSH)
	α -N-Acetil-glucosaminidasa (NAGLU)
	α -Glucosaminidasa-N-acetiltransferasa
	N-Acetilgalactosamina-6-sulfatasa
	β -Galactosidasa
	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatasa

Enfermedad	Proteína lisosómica
	β -Glucuronidasa
	Hialuronidasa
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa
Enfermedad de Pompe	Alfa-1,4-glucosidasa (ácida)
Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa, o su subunidad α
Enfermedad de Schindler	Alfa-N-acetilgalactosaminidasa (NAGA); α -galactosaminidasa
Síndrome de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A
Sialidosis	Neuraminidasa

Fig.1



Fig. 2

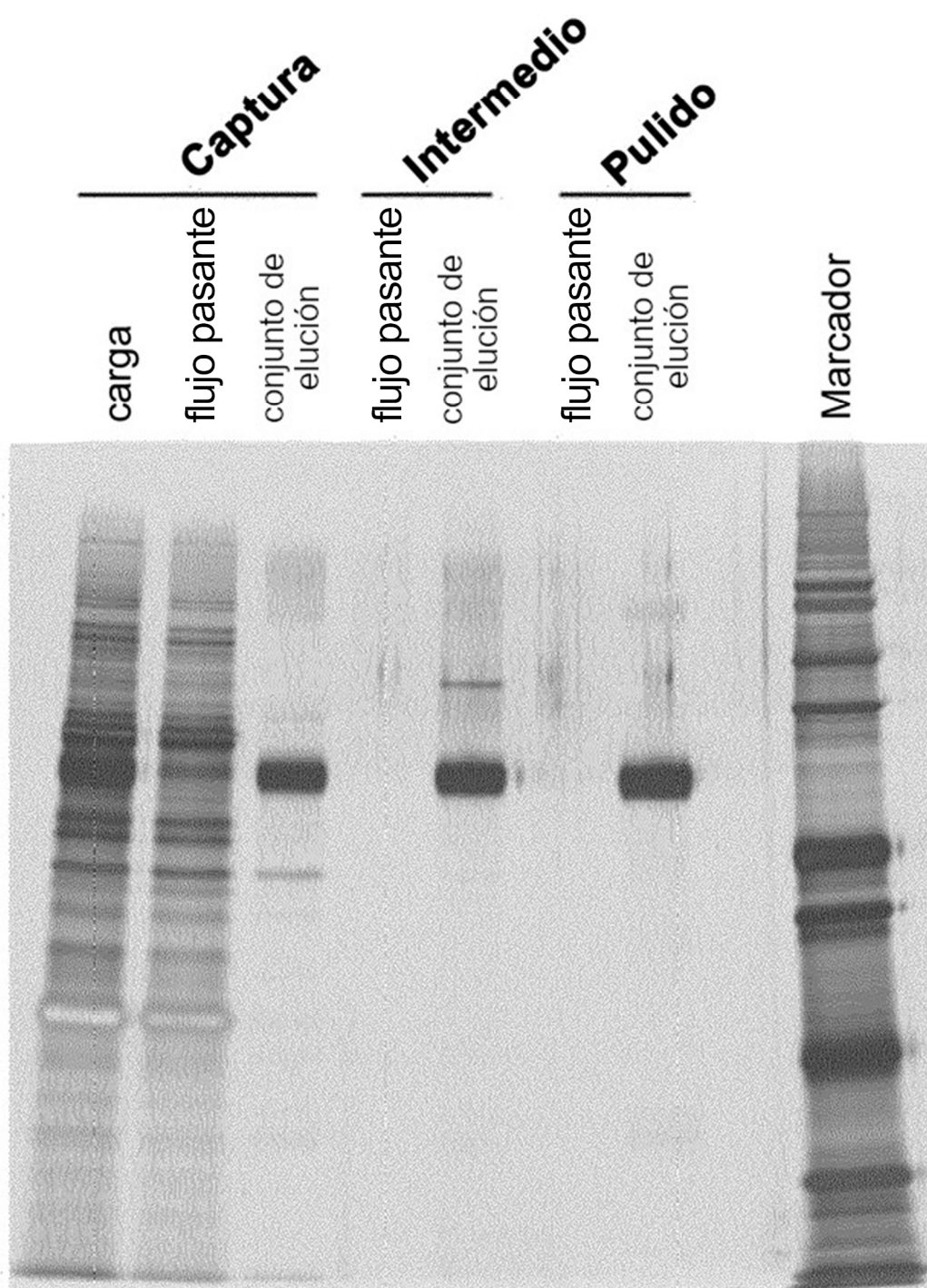


Fig. 3

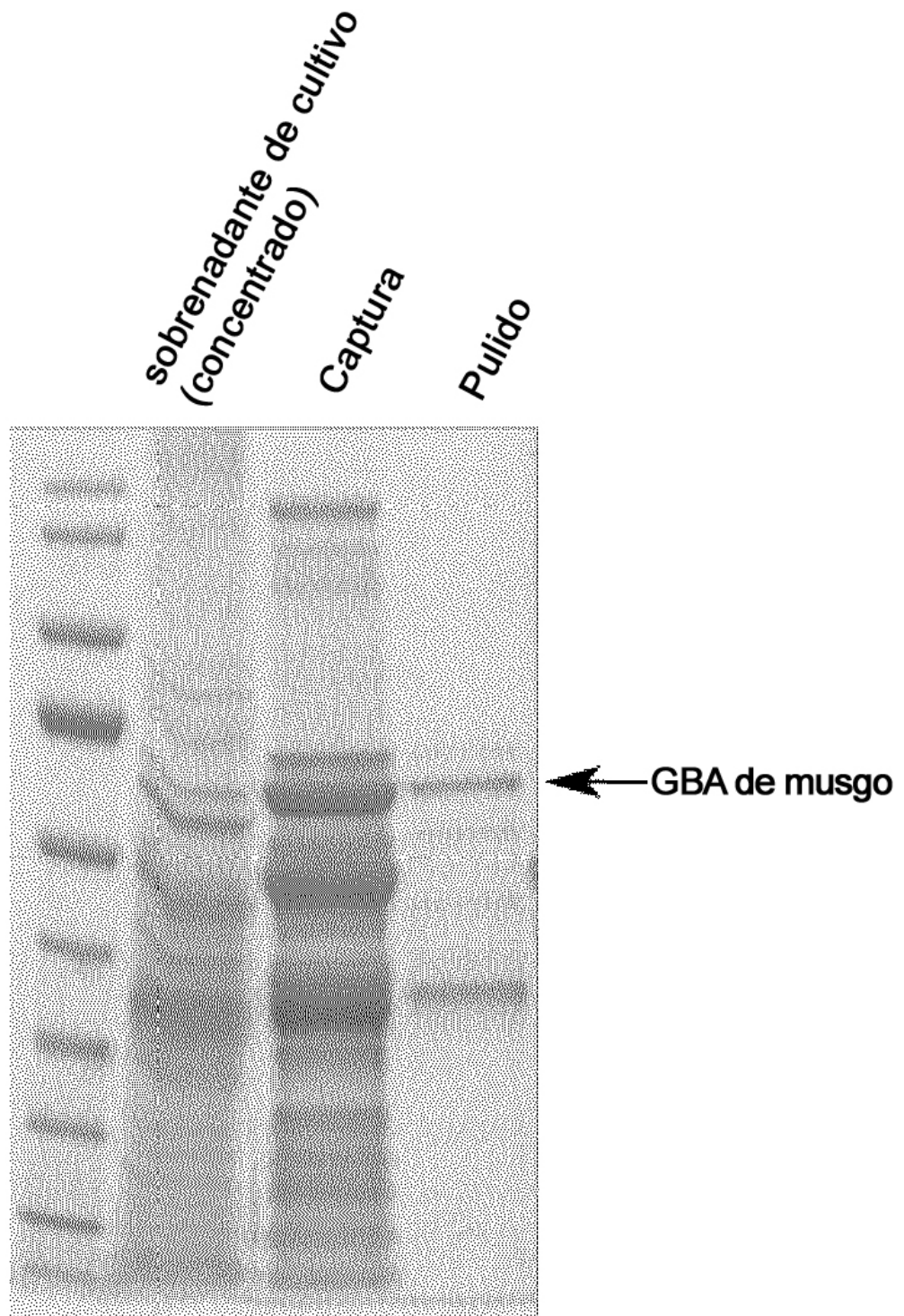


Fig. 4

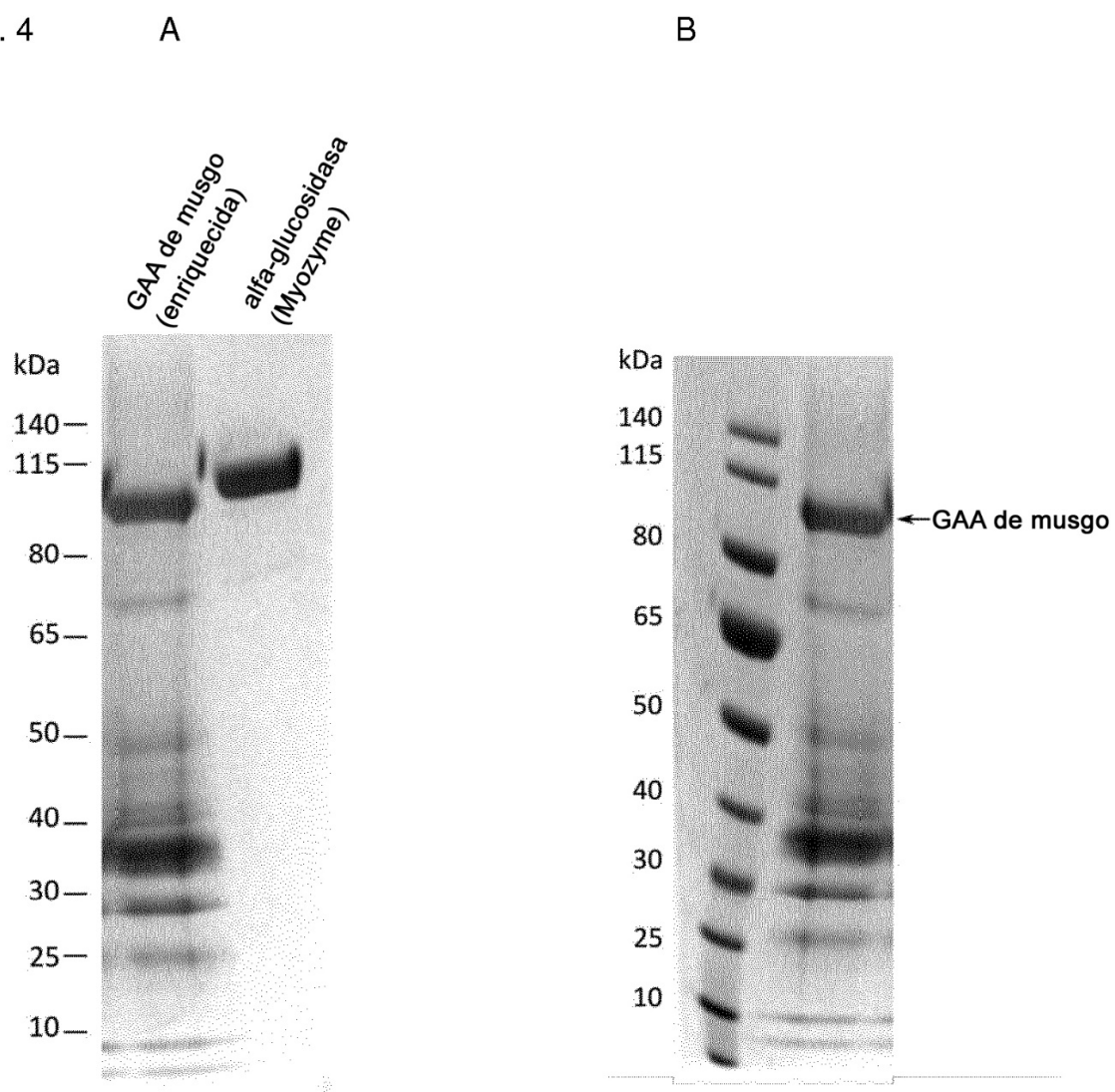


Fig. 5

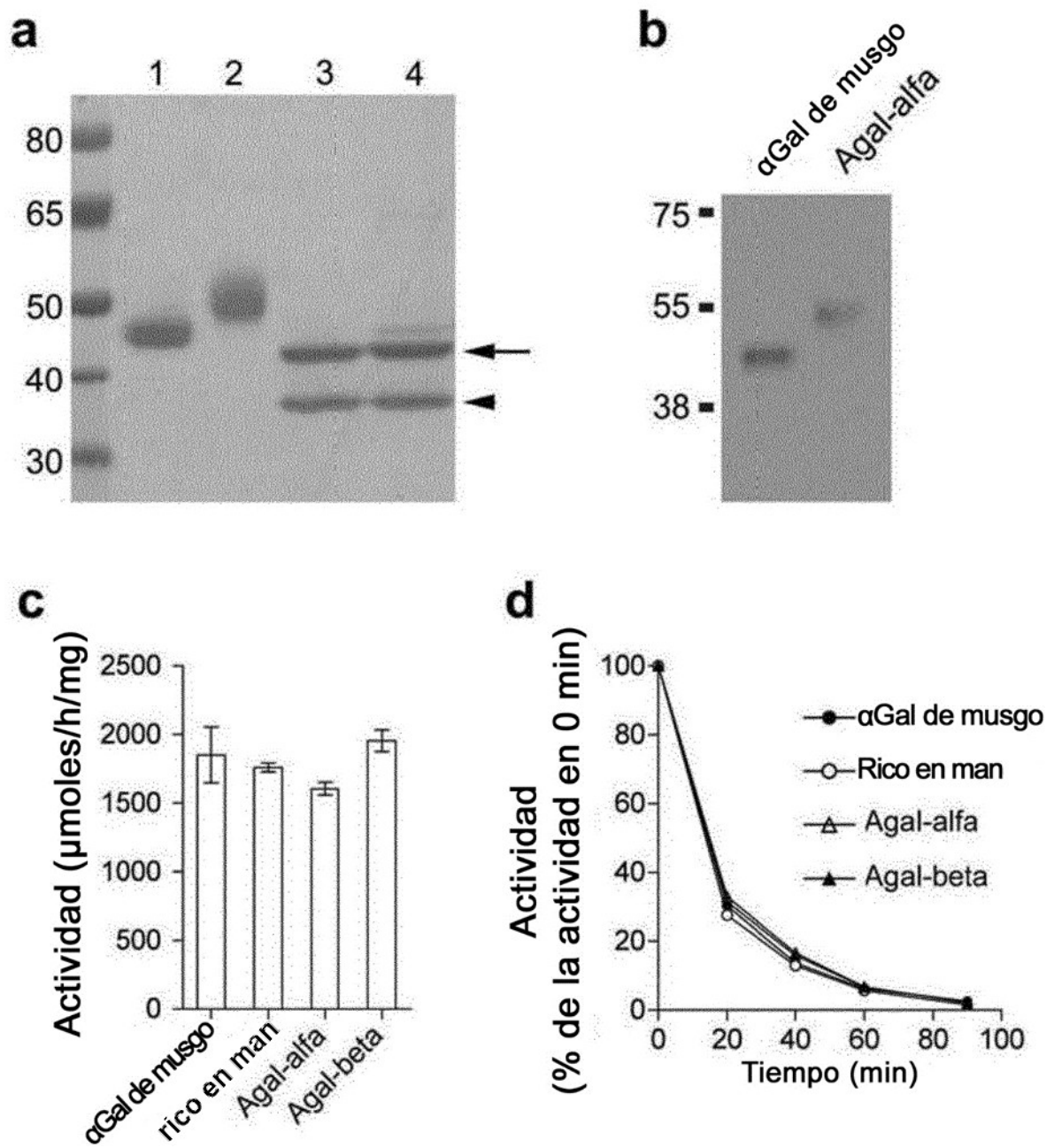


Fig. 6

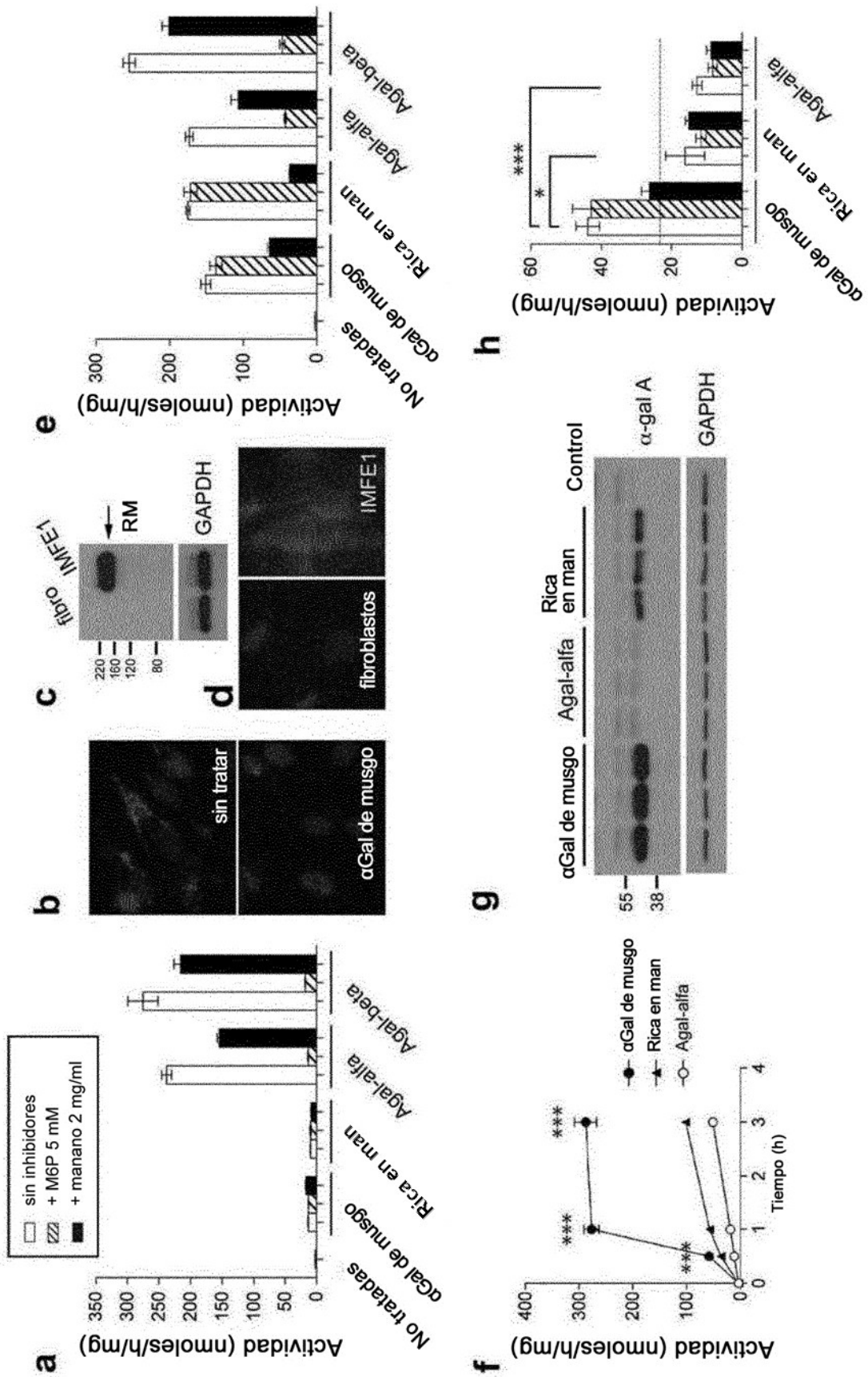


Fig. 7

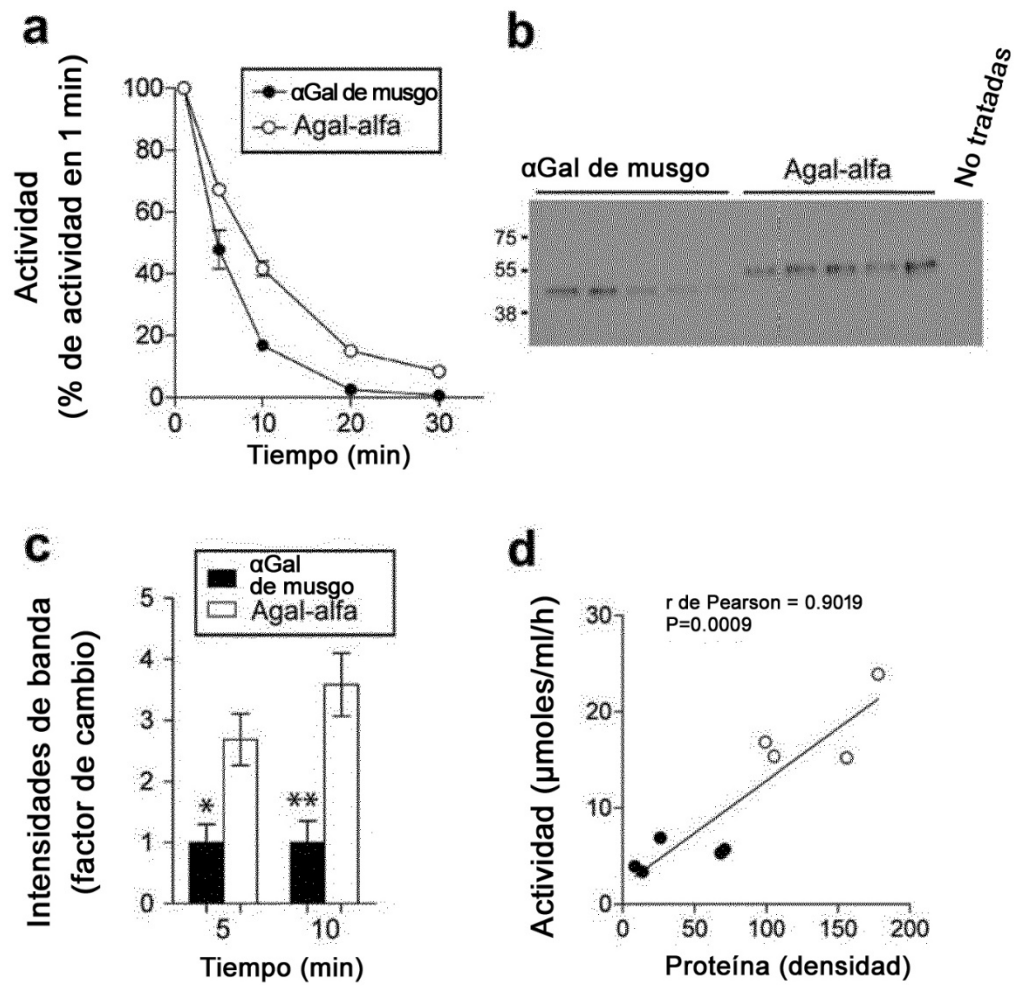


Fig. 8

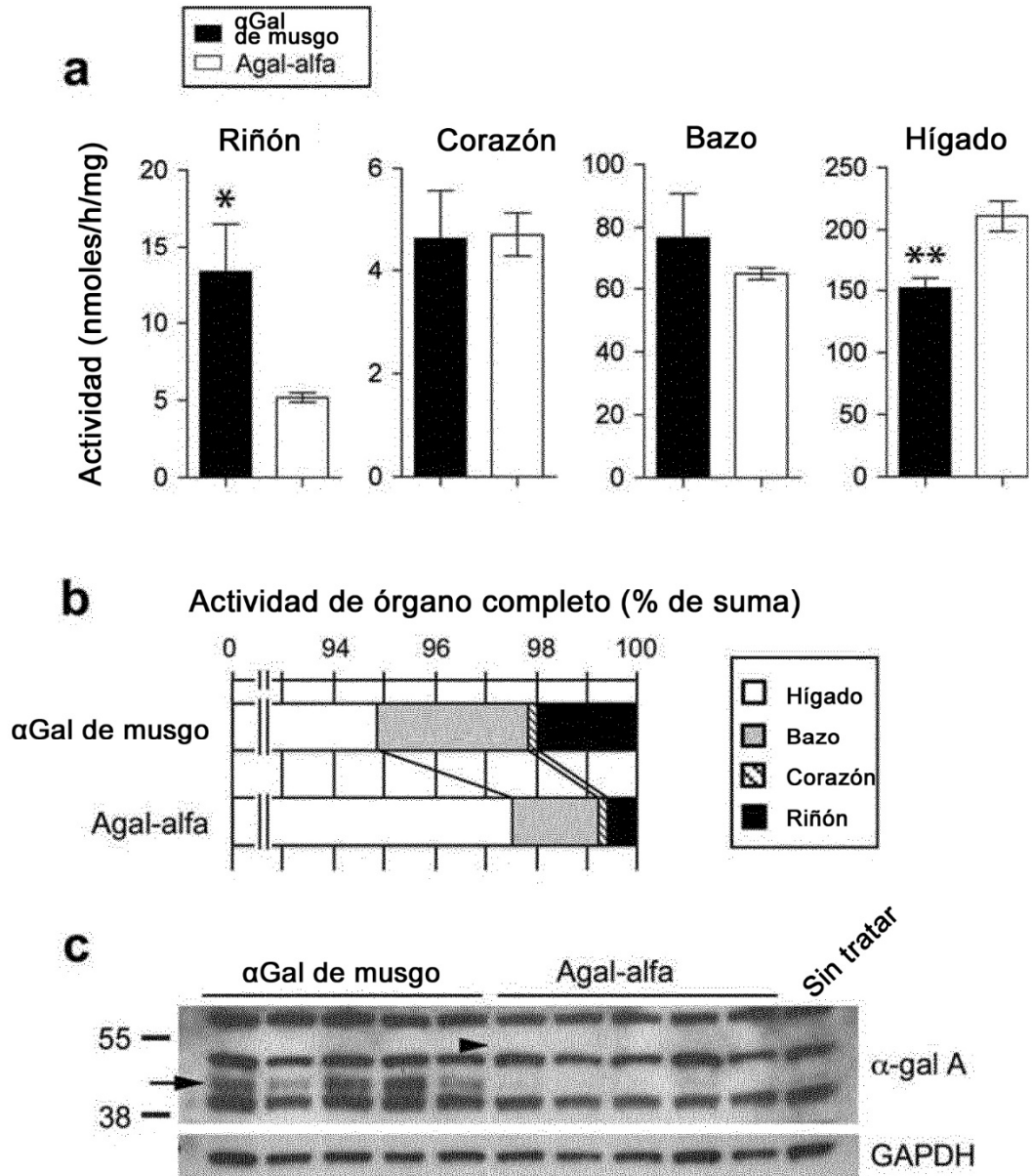


Fig. 9

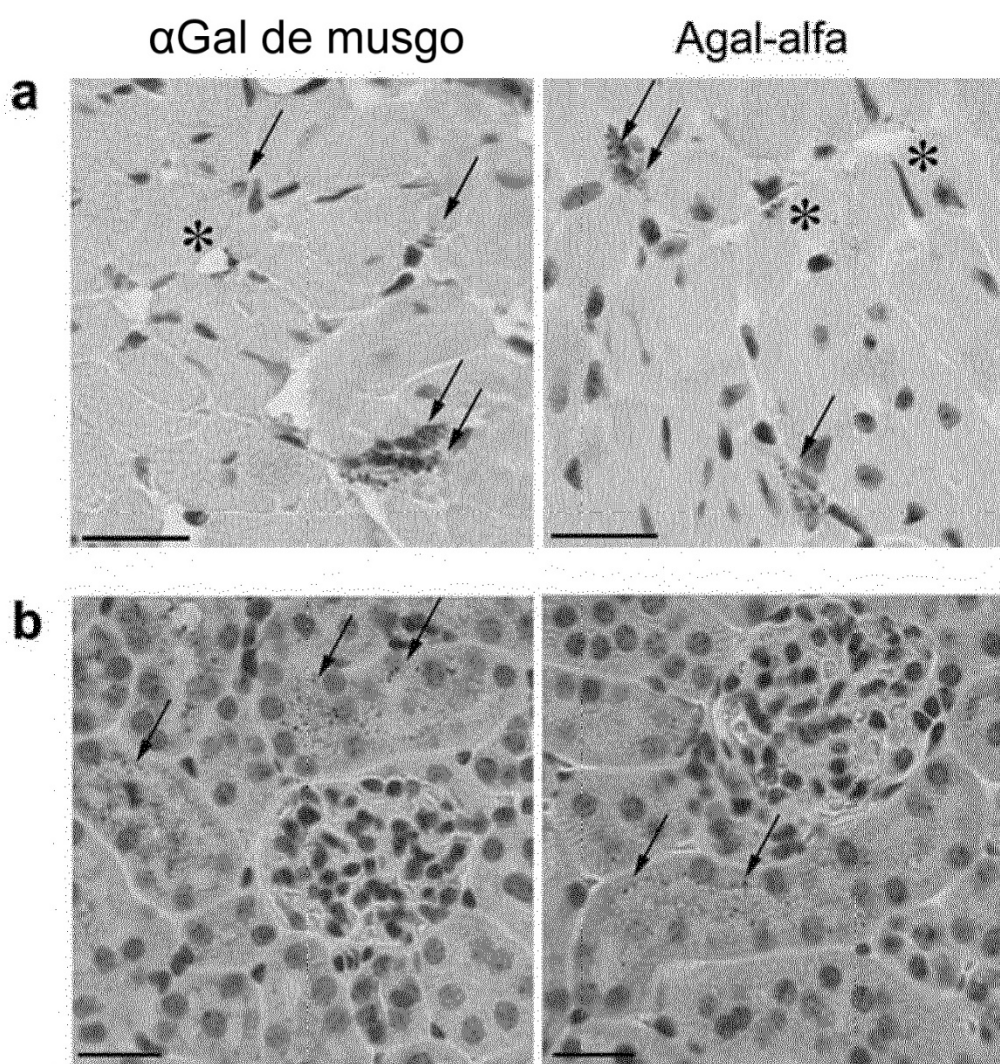


Fig. 10

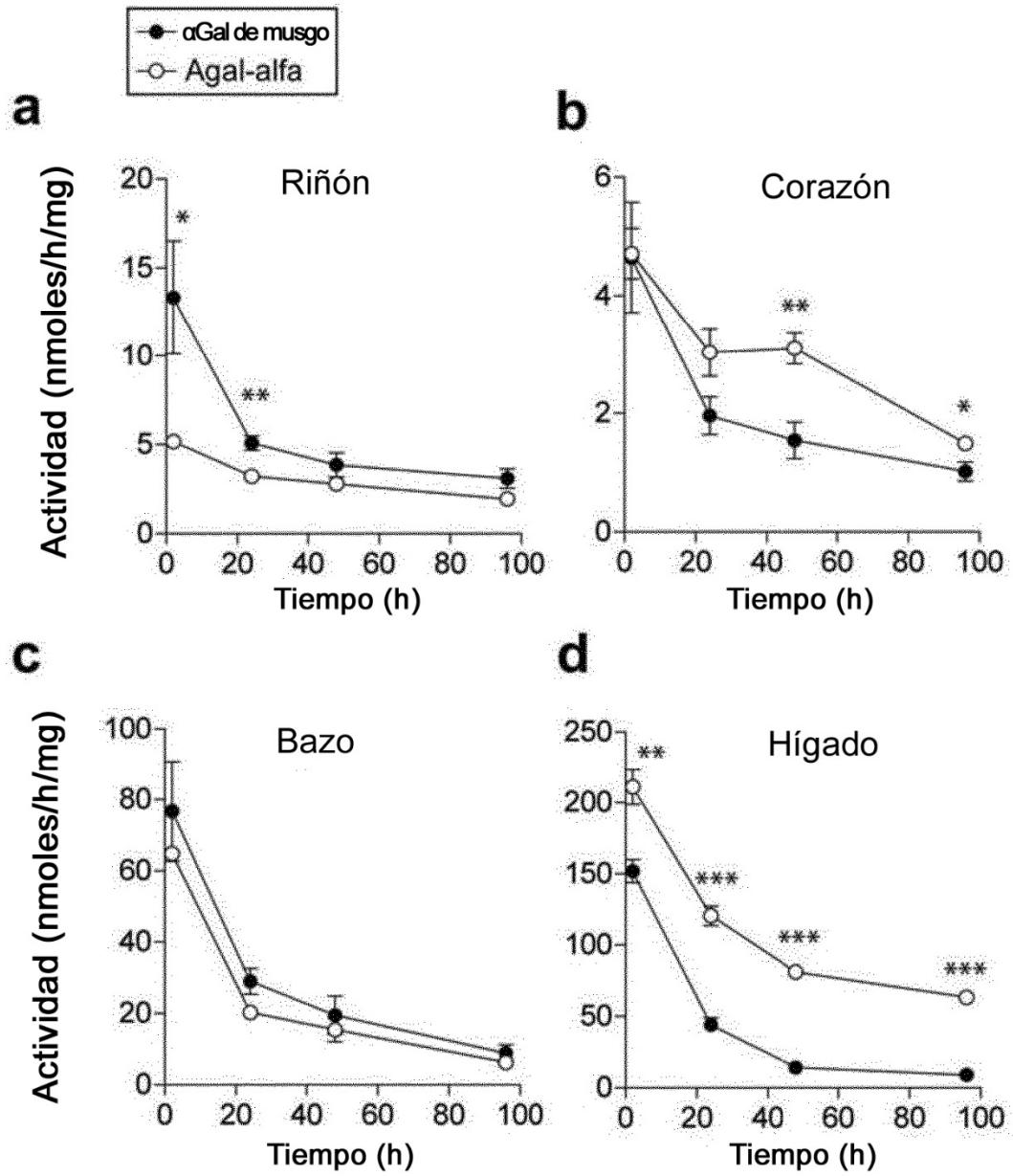


Fig. 11

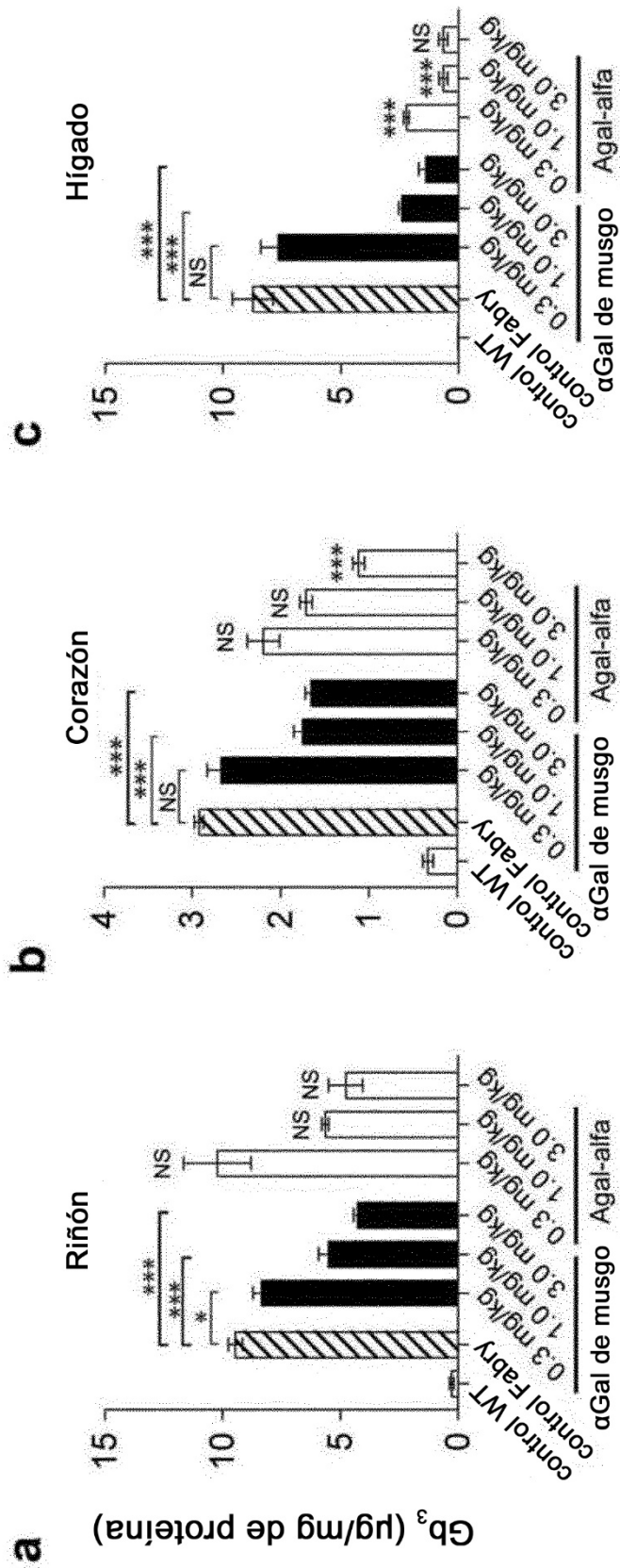


Fig. 12

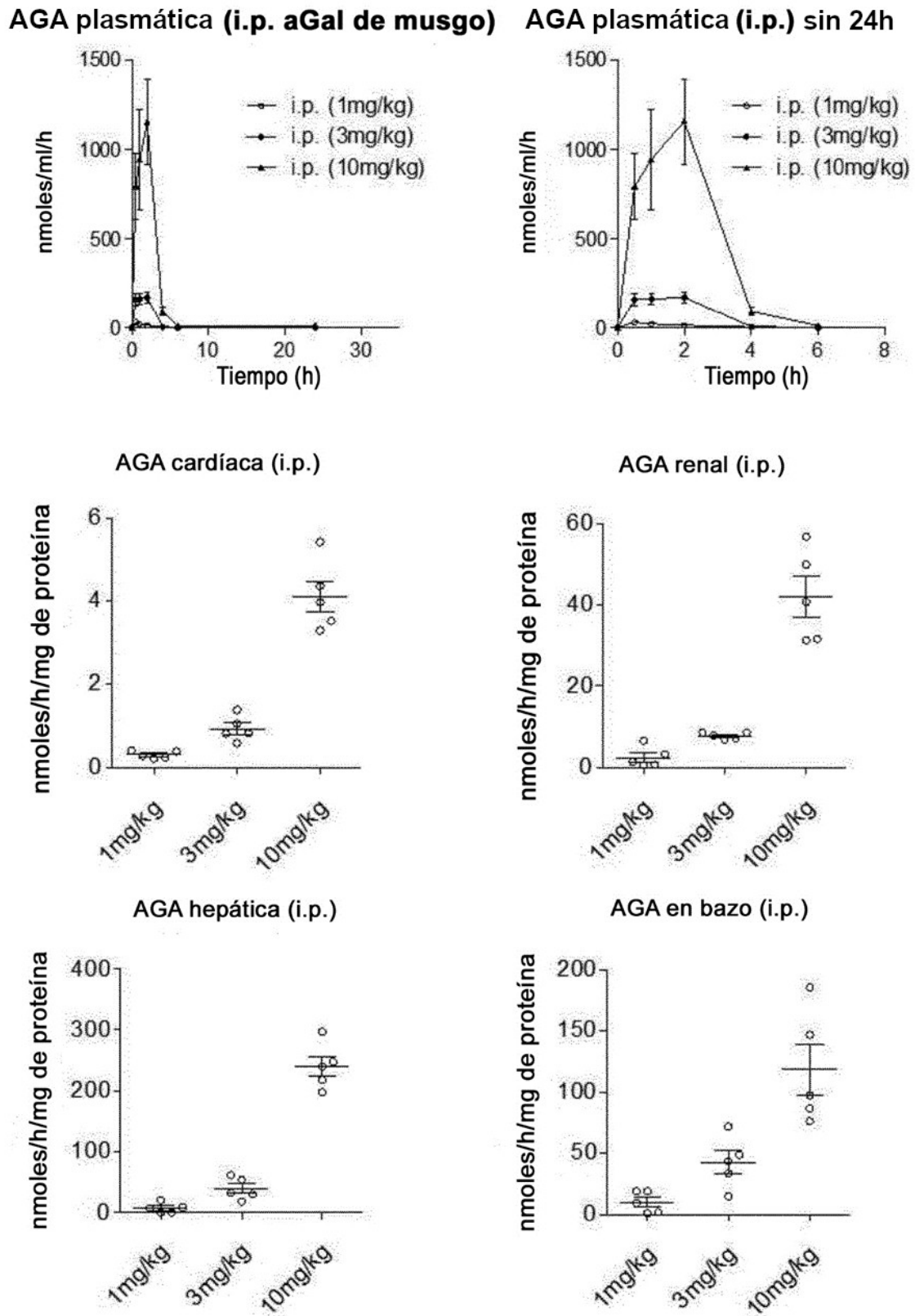
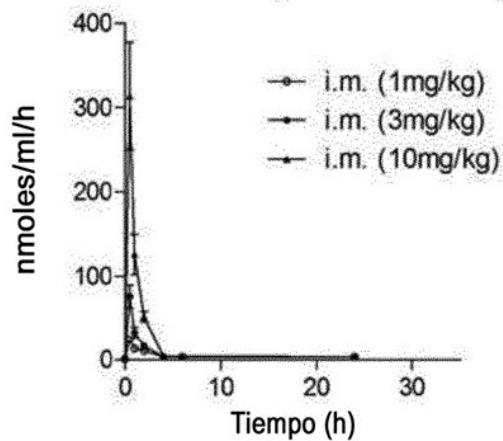
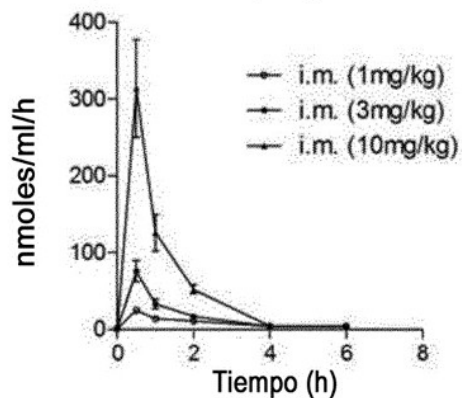


Fig. 13

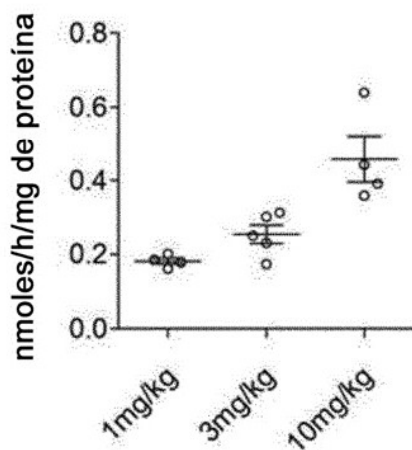
AGA plasmática (i.m. aGal de musgo)



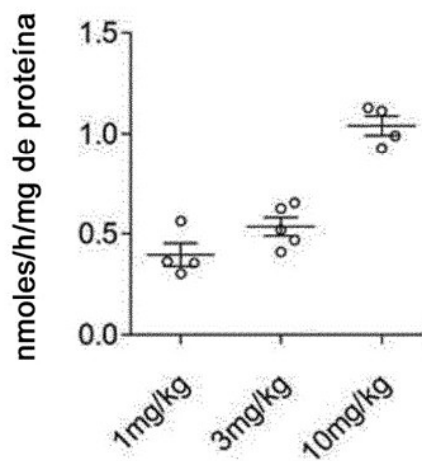
AGA plasmática (i.m.) sin 24h



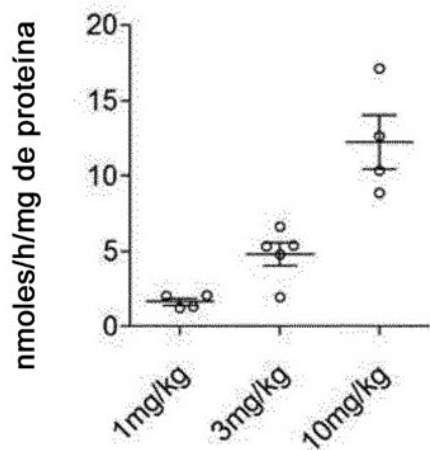
AGA cardíaca (i.m.)



AGA renal (i.m.)



AGA hepática (i.m.)



AGA en bazo (i.m.)

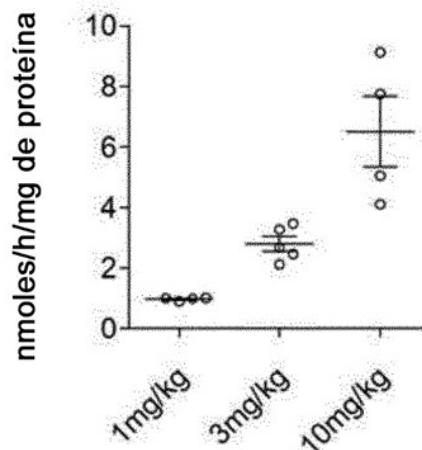


Fig. 14

